

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Denisa Folprechtová

ENANTIOSELEKTIVNÍ POTENCIÁL
SULFOBUTYLETHER- β -CYKLODEXTRINOVÉ CHIRÁLNÍ
STACIONÁRNÍ FÁZE
Enantioselective potential of sulfobutylether- β -cyclodextrin
based chiral stationary phase

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Gabriela Kučerová

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20.8.2018

podpis

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu dvou nových chirálních stacionárních fází (CSF), obsahujících různě substituovaný sulfobutylether- β -cyklodextrin (SBE- β -CD), dynamickým pokrytím iontově výměnných stacionárních fází (SF), zjištění enantioseparační schopnosti a stability nově připravených CSF.

Tyto parametry byly testovány na sadě chirálních analytů. Testovaná sada obsahovala strukturně odlišné skupiny analytů: benzodiazepiny (oxazepam, lorazepam), fenothiaziny (thioridazin, promethazin), β -blokátory (labetalol, pindolol, propranolol, alprenolol), profeny (karprofen, fenoprofen, flurbiprofen, indoprofen), flavanony (6-hydroxyflavanon, 7-hydroxyflavanon), DL-tryptofan a jeho deriváty (5-OH-DL-tryptofan, 5-F-DL-tryptofan, DL-tryptofan butylester a blokovanou aminokyselinu (*t*-Boc-DL-tryptofan)), dipeptidy glycyl-DL-fenylalanin a glycyl-DL-tryptofan a Trogerovu bázi. Chirální separace probíhaly v reverzním módu vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Testované mobilní fáze byly tvořeny těmito složkami: methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) a methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) v různých objemových poměrech.

Na první připravené CSF s hexasubstituovaným SBE- β -CD byly při použití kyseliny mravenčí jako vodné složky mobilní fáze nalezeny podmínky pro enantioseparaci jedenácti analytů, z toho enantiomery čtyř analytů byly separovány na základní linii a sedm bylo enantioseparováno částečně.

Druhá připravená CSF s dekasubstituovaným SBE- β -CD vykazovala enantioselektivitu pro osm analytů, z toho pět bylo enantioseparováno na základní linii. Tato fáze měla vyšší enantioselektivitu pro testované profeny a thioridazin než CSF s hexasubstituovaným SBE- β -CD.

Klíčová slova

sulfobutylether- β -cyklodextrin, chirální separace, chirální stacionární fáze

Abstract

The aim of this diploma thesis was to prepare two new chiral stationary phases by dynamic coating of sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) with varying degrees of substitution onto strong anion-exchange stationary phases. The enantioselective potential and stability of the newly prepared chiral stationary phases were tested using a set of chiral analytes.

The set contained structurally diverse analytes, i.e. benzodiazepines (oxazepam, lorazepam), phenothiazines (thioridazine, promethazine), β -blockers (labetalol, pindolol, propranolol, alprenolol), profens (carprofen, fenoprofen, flurbiprofen, indoprofen), flavanones (6-hydroxyflavanone, 7-hydroxyflavanone), DL-tryptophan and its derivatives (5-OH-DL-tryptophan, 5-F-DL-tryptophan, DL-tryptophan butylester and blocked aminoacid (*t*-Boc-DL-tryptophan)), dipeptides (glycyl-DL-phenylalanine, glycyl-DL-tryptophan) and Troger's base. Measurements were carried out in reversed-phase high-performance liquid chromatography. Mobile phases consisted of methanol/formic acid (pH 2.10) and methanol/10mmol l⁻¹ ammonium acetate buffer (pH 4.00) in various volume ratios.

The chiral stationary phase containing hexasubstituted SBE- β -CD was suitable for enantioseparation of eleven analytes. Four of them were baseline enantioresolved and seven partially. The chiral stationary phase containing decasubstituted SBE- β -CD was suitable for enantioseparation of eight analytes, five of them were baseline enantioresolved. This phase showed higher enantioselectivity for profens and thioridazine enantiomers than the hexasubstituted SBE- β -CD phase.

Key words

sulfobutylether- β -cyclodextrin, chiral separation, chiral stationary phase

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D., za její odborné vedení, pomoc, cenné rady, vstřícnost a milý přístup při tvorbě diplomové práce. Dále bych také ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Gabriele Kučerové za ochotu a pomoc při vypracovávání experimentální části práce.

OBSAH

1	ÚVOD.....	- 10 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 11 -
2.1	Chiralita	- 11 -
2.2	Chirální separace.....	- 12 -
2.2.1	Chirální separace v HPLC	- 12 -
2.2.2	Chirální stacionární fáze	- 13 -
2.3	Cyklodextriny	- 14 -
2.3.1	Historie	- 14 -
2.3.2	Struktura a vlastnosti cyklodextrinů	- 15 -
2.3.3	Inkluzní komplex.....	- 16 -
2.3.4	Použití cyklodextrinů.....	- 17 -
2.3.5	Deriváty cyklodextrinů	- 19 -
2.3.6	Sulfobutylether- β -cyklodextrin	- 19 -
2.4	Dynamické pokrytí („coating“).....	- 20 -
2.5	Modelové chirální analyty použité v této práci.....	- 21 -
2.5.1	Benzodiazepiny	- 21 -
2.5.2	Profeny	- 21 -
2.5.3	β -blokátory	- 21 -
2.5.4	Flavanony	- 22 -
2.5.5	Deriváty fenothiazinů	- 22 -
2.5.6	Aminokyseliny a peptidy	- 22 -
2.5.7	Trogerova báze	- 23 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 24 -
3.1	Chemikálie	- 24 -
3.2	Přístroje a pomůcky	- 26 -

3.2.1	Kapalinový chromatograf.....	- 26 -
3.2.2	Chromatografická kolona	- 26 -
3.2.3	Ostatní přístroje a pomůcky.....	- 26 -
3.2.4	Programy	- 27 -
3.3	Příprava vzorků.....	- 27 -
3.4	Dynamické pokrytí stacionární fáze SBE- β -CD.....	- 27 -
3.5	Příprava mobilních fází.....	- 28 -
3.6	Podmínky separace	- 28 -
3.7	Mrtvý čas kolony	- 29 -
3.8	Chromatografické parametry	- 29 -
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	- 30 -
4.1	Chirální separace.....	- 30 -
4.1.1	Chirální separace na připravené CSF s SBE- β -CD (DS ~ 6,3)	- 31 -
4.1.2	Chirální separace na připravené CSF s SBE- β -CD (DS ~ 10)	- 43 -
4.1.3	Porovnání CSF s SBE- β -CD (DS ~ 6,3) a (DS ~ 10).....	- 53 -
5	ZÁVĚR.....	- 56 -
6	Použitá literatura.....	- 58 -

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

CD	cyklodextrin
[CD]	rovnovážná koncentrace cyklodextrinu
[CD-S]	rovnovážná koncentrace inkluzního komplexu CD-substrát
CEC	kapilární elektrochromatografie
c_M	hmotnostní koncentrace
CS	chirální selektor
CSF	chirální stacionární fáze
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DL-Trp	DL-tryptofan
DS	stupeň substituce
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GC	plynová chromatografie
Gly-DL-Phe	glycyl-DL-fenylalanin
Gly-DL-Trp	glycyl-DL-tryptofan
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K	zdánlivá rovnovážná konstanta tvorby inkluzního komplexu
k_1, k_2	retenční faktor prvního a druhého eluujícího enantiomeru
MF	mobilní fáze
NSAIDs	nesteroidní protizánětlivá léčiva
PTFE	polytetrafluorethylen
pK_A	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
R	rozlišení
RP-HPLC	reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie
S	substrát
[S]	rovnovážná koncentrace substrátu
SBE- β -CD	sulfobutylether- β -cyklodextrin
SF	stacionární fáze

SFC	superkritická fluidní chromatografie
<i>t</i> -Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonylová blokovácí skupina
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	<i>tert</i> -butoxykarbonyl-DL-tryptofan
TLC	tenkovrstvá chromatografie
<i>t</i> _M	mrtvý čas kolony
<i>t</i> _R	retenční čas analytu
<i>t</i> _{R1} , <i>t</i> _{R2}	retenční čas prvního a druhého eluujícího enantiomeru
<i>w</i> ₁ , <i>w</i> ₂	šířka píku v polovině výšky píku prvního a druhého eluujícího enantiomeru
5-OH-DL-Trp	5-hydroxy-DL-tryptofan
5-F-DL-Trp	5-fluor-DL-tryptofan
α	faktor selektivity

1 ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současnosti jednou z nejrozšířenějších metod používaných pro separace chirálních látek. Chirální separace se využívají v různých průmyslových oblastech (potravinářství, agrochemický průmysl, biotechnologie aj.), přičemž stěžejní je farmaceutický průmysl. Nově syntetizovaná léčiva jsou často syntetizována jako racemáty, a proto je velmi důležité otestovat vlastnosti jednotlivých enantiomerů (např. stereoselektivní interakce mezi léčivem a receptorem, metabolismus, farmakokinetika, stabilita a toxicita aj.) a jejich vliv na lidský organismus.^{1,2}

S chiralitou se setkáváme u spousty přírodních látek, které se velmi často vyskytují ve formě jednoho isomeru. Všechny proteinogenní aminokyseliny jsou L-isomery, kdežto přírodně vyskytující se sacharidy patří do konfigurační řady D.³

Při chirálních separacích hraje důležitou roli výběr vhodného chirálního selektoru (CS) použitého k přípravě chirální stacionární fáze (CSF). Ačkoliv je v současné době k dispozici mnoho různých CSF, na kterých lze separovat enantiomery rozličných chirálních látek, výzkum a vývoj stále pokračuje se snahou zvýšit efektivitu, stereoselektivitu a především univerzálnost nových CSF.²

Cílem této práce byla příprava nových chirálních stacionárních fází tzv. dynamickým pokrytím neboli „coatingem“ sulfobutylether- β -cyklodextrinu na dvě iontově výměnné kolony. Enantioseparační schopnosti v reverzním módu HPLC (RP-HPLC) a stabilita připravených stacionárních fází byly testovány na sadě strukturně odlišných chirálních analytů. Tyto chirální stacionární fáze byly následně vzájemně porovnány z hlediska jejich enantioselektivního potenciálu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chiralita

Chiralita byla objevena v roce 1848 francouzským chemikem Louisem Pasteurem, který se věnoval studiu krystalografie, během kterého objevil enantiomery kyseliny vinné.^{4,5}

Chiralita, pojem odvozený z řeckého slova *cheir* – ruka⁴, je vlastnost popisující asymetrické prostorové uspořádání molekul či objektů. Za chirální molekuly jsou považovány takové, které nejsou ztotožnitelné se svými zrcadlovými obrazy. Molekuly nemohou být chirální, pokud mají rovinu symetrie, střed symetrie nebo rotačně-reflexní osu.⁶

Chirální sloučeniny se vyskytují jako zvláštní typ stereoisomerů, které jsou navzájem svými zrcadlovými obrazy, a jsou nazývány enantiomery. Důležitou vlastností enantiomerů je jejich optická aktivita, tj. schopnost stáčet rovinu lineárně polarizovaného světla o určitý úhel α . Podle směru, jakým enantiomer stáčí rovinu lineárně polarizovaného světla, je označován znaménkem (+) doprava (ve směru hodinových ručiček) nebo (–) doleva (proti směru hodinových ručiček). Ekvimolární množství enantiomerů ve směsi neboli racemát není opticky aktivní.^{3,4} K popsání absolutní konfigurace na stereogenních centrech jsou konvenčně používány symboly *R* (*rectus* – pravý) a *S* (*sinister* – levý).⁷

Zatímco v nechirálním prostředí mají enantiomery shodnou většinu fyzikálně-chemických vlastností, interakcí s chirálním objektem se jejich vlastnosti liší. Typickým příkladem chirálního prostředí je i živý organismus, kde některé enantiomery vykazují rozdíly v intenzitě a typu biologického účinku.⁷⁻⁹ Analýza chirálních látek je proto důležitá v potravinářském¹⁰ a agrochemickém průmyslu¹¹, ale především v oblasti farmacie, kdy jeden enantiomer dané léčivé látky vykazuje požadovaný terapeutický účinek, zatímco druhý může být neaktivní, může mít slabší účinek nebo naopak účinek nežádoucí až toxický. Typickým příkladem je thalidomid, který byl ve formě racemátu podáván těhotným ženám proti ranním nevolnostem. Jeho *R*-enantiomer má antiemetický a sedativní účinek, kdežto *S*-enantiomer vykazuje teratogenní účinky¹². Dalším příkladem

může být β -blokátor propranolol, jehož *S*-enantiomer má mnohem vyšší afinitu k β -adrenergním receptorům a je tedy až stonásobně účinnější než *R*-enantiomer.¹³

Přítomnost atomu uhlíku, na kterém jsou navázány čtyři odlišné substituenty, patří k nejčastějším příčinám chiralit molekul. Takový atom je centrem chiralit a je označován jako stereogenní centrum, dříve také asymetrický nebo chirální atom uhlíku.⁴ Stereogenním centrem nemusí být pouze atom uhlíku, ale např. heteroatomy síry, dusíku nebo fosforu.³ Dalším prvkem odpovídajícím za chiralitu molekuly může být tzv. osa chiralit (axiální chiralita) nebo rovina chiralit (planární chiralita).⁶

2.2 Chirální separace

Separace enantiomerů jsou důležitým nástrojem při výzkumu opticky aktivních látek, především při výzkumu, vývoji a testování nových léčiv, ale i pesticidů nebo potravinových aditiv. Enantiomery však lze separovat pouze v chirálním prostředí, kde mohou stereoselektivně interagovat. Nejrozšířenější separační technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie.¹

Mezi další enantioseparační metody patří superkritická fluidní chromatografie (SFC), plynová chromatografie (GC), tenkovrstvá chromatografie (TLC), dále také elektromigrační metody: kapilární zónová elektroforéza (CZE) nebo kapilární elektrochromatografie (CEC).¹⁴

2.2.1 Chirální separace v HPLC

HPLC je široce rozšířeným a dostupným prostředkem pro analýzu chirálních látek. Vyniká svou účinností, robustností, opakovatelností a reprodukovatelností.¹⁵ Separace enantiomerů mohou být provedeny dvěma způsoby: nepřímou a přímou metodou.¹⁶

Nepřímá metoda chirální separace je založena na tvorbě páru diastereoisomerů, což jsou stereoisomery s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které lze následně separovat v nechirálním prostředí.¹⁷ Diastereoisomery vznikají derivatizací chirální látky opticky čistým derivatizačním činidlem. Mezi hlavní výhody nepřímé metody patří možnost separace na nechirálních stacionárních fázích, změna elučního pořadí enantiomerů nebo dobrá selektivita. Mezi nevýhody se řadí nutnost použití

derivatizačních činidel o vysoké optické čistotě, možnost vzniku vedlejších produktů nebo racemizace.¹⁸

Přímá metoda využívá buď chirální stacionární fáze nebo mobilní fáze (MF) s přídavkem chirálního selektoru, přičemž stacionární fáze může být nechirální.¹⁶ Separace chirálních sloučenin použitím vhodného CS rozpuštěného v MF je založena na tvorbě přechodného diastereomerního komplexu mezi chirálním analytem a CS. Takto vzniklé komplexy se mohou lišit svou stabilitou, rozpustností v MF či afinitou k SF, což ovlivní retenci a separaci jednotlivých enantiomerů. Stabilnější diastereomerní komplex bude v koloně zadržován déle a bude tedy eluovat s vyšším retenčním časem než druhý méně stabilní diastereomerní komplex. Výhodou tohoto uspořádání je především jednoduchá výměna CS. Nevýhodou je vysoká spotřeba CS.¹⁹

V HPLC je častěji používáno uspořádání s chirálními stacionárními fázemi, které mohou být využity v reverzním, normálním a polárně-organickém módu nebo hydrofilní interakční kapalinové chromatografii (HILIC).²⁰

V HPLC s CSF se uplatňuje stejný typ separačního mechanismu jako v případě přídavku CS do MF – vznik přechodných diastereomerů, ale v tomto případě je CS navázán na povrchu nosiče a mobilní fáze je zpravidla nechirální. Mezi intermolekulární interakce, které přispívají k tvorbě diastereomerních komplexů mezi CS a chirálním analytem, patří vodíkové vazby, sterické bránění, π - π interakce, van der Waalsovy síly, interakce dipól-dipól, hydrofobní efekt, elektrostatické interakce aj. v závislosti na použitém chromatografickém systému.²¹

Mechanismus chirálního rozpoznávání je založen na modelu tříbodové interakce, navrženém C. E. Dalglishem, pro který platí, že pro chirální separaci je potřeba minimálně tří současných interakcí mezi CS a enantiomery, přičemž alespoň jedna interakce musí být stereoselektivní.^{9,21}

2.2.2 Chirální stacionární fáze

Stacionární fáze pro chirální separace se dělí do skupin na základě typu použitého chirálního selektoru. Běžně používané CSF jsou na bázi polysacharidů, proteinů, crown etherů, cyklofruktanů, makrocyclických antibiotik, výměny ligandů nebo cyklodextrinů, které byly použity i v této práci a je jim věnována samostatná kapitola.^{14,22,23}

Polysacharidový typ CSF využívá opticky aktivní deriváty amylosy či celulosy.²⁴ V CSF na bázi proteinů jsou na silikagelovém nosiči navázány různé typy proteinů: albuminy (lidský sérový albumin a hovězí sérový albumin), glykoproteiny (α -kyselý glykoprotein, ovomukoid) aj.²⁵ Pro separace chirálních sloučenin s primární aminoskupinou jsou používány CSF na bázi crown etherů – makrocyclických polyetherů, které obsahují kavitu specifické velikosti. Vznik chirálních crown etherů je podmíněn začleněním chirální molekuly do jejich struktury.²⁶ Cyklofruktany jsou cyklické oligosacharidy, které jsou tvořeny z šesti, sedmi nebo osmi β -(2,1) vazbou spojenými D-fruktofuranosovými jednotkami. Pro chirální separace jsou používány pouze deriváty cyklofruktanů.²⁷ CSF na bázi makrocyclických antibiotik lze dělit do následujících skupin: ansamyciny (rifamyciny), glykopeptidy (teikoplanin, vankomycin, ristocetin A, avoparcin a jejich analogy), polypeptidy a aminoglykosidy.²⁸ Princip ligandově-výměnných CSF spočívá v tvorbě koordinačních komplexů, které se skládají z centrálního atomu přechodného kovu, CS a enantiomeru.^{14,29}

2.3 Cyklodextriny

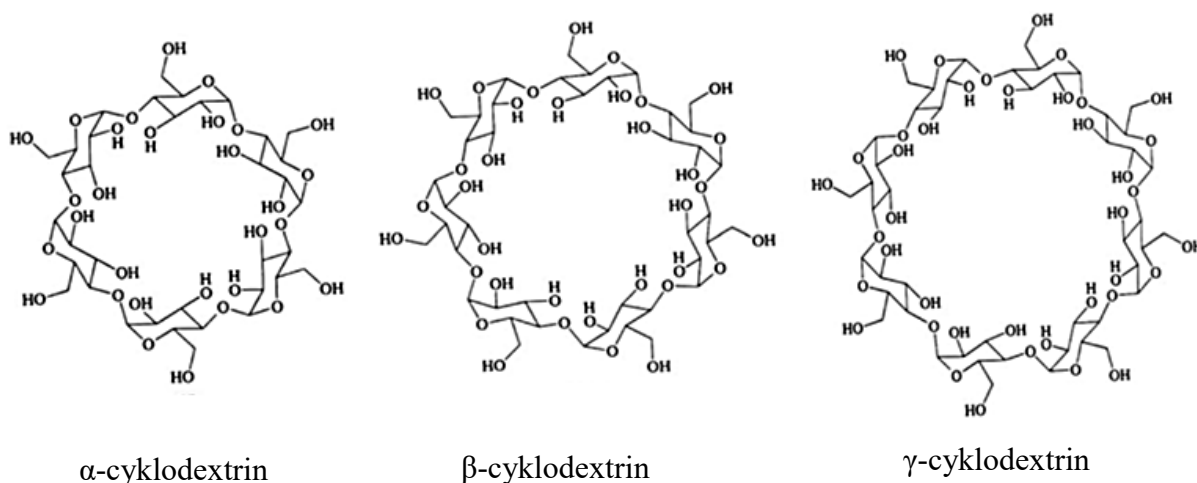
2.3.1 Historie

Cyklodextriny (CD) byly poprvé objeveny v roce 1891 francouzským vědcem A. Villierem, jemuž se podařilo izolovat krystalickou látku vzniklou působením bakterie *Bacillus macerans* na škrob, kterou následně pojmenoval jako celulosin. Na Villiera navázal rakouský mikrobiolog F. Schardinger, který izoloval dvě krystalické sloučeniny, které nazval α -dextrinem a β -dextrinem. Studium těchto látek se zabýval několik let a tím přispěl k podrobnému popisu jejich vlastností. γ -cyklodextrin byl objeven v roce 1935 Freudenbergem a Jacobim. V polovině 20. století byly popsány základní strukturní i fyzikálně-chemické vlastnosti cyklodextrinů, včetně jejich klíčové schopnosti inkludovat jiné molekuly uvnitř svých chirálních kavit.^{30,31} Právě tvorba inkluzních komplexů zvýšila zájem o studium cyklodextrinů a vedla k jejich dalšímu vývoji a aplikaci v různých průmyslových odvětvích.³² První CSF s chemicky vázanými CD na silikagelovém nosiči SF byly vyvinuty D. W. Armstrongem.¹⁴

2.3.2 Struktura a vlastnosti cyklodextrinů

Cyklodextriny jsou cyklické neredukující oligosacharidy složené z D-glukopyranosových jednotek, které jsou spojeny α -1,4-glykosidickou vazbou.²⁰ CD vznikají enzymatickou degradací škrobu, která je způsobena činností amylas (cyklodextrin glukosyltransferasa) některých bakterií jako *Bacillus macerans* nebo *Bacillus alkalophilus*. Produktem enzymatického štěpení je směs lineárních a cyklických maltooligosacharidů, přičemž požadovaný CD je ze směsi izolován precipitací vhodnou organickou sloučeninou (př. 1-dekanol, toluen, cyklohexadecenol).^{32,33} Mezi nejvíce zastoupené cyklodextriny patří α -, β - a γ -CD, které obsahují cykly s šesti, sedmi a osmi glukopyranosovými jednotkami, které zaujímají 4C_1 židličkovou konformaci.³⁰

Cyklodextriny strukturně připomínají dutý komolý kužel, pro který je typické, že vnitřní dutina (kavita) má lipofilní charakter, zatímco vnější část je hydrofilní. Na vnějším širším okraji se vyskytují sekundární hydroxylové skupiny (na atomech C2 a C3), na užším okraji se nachází primární hydroxylové skupiny (atom C6).^{9,34} Každá glukopyranosová jednotka CD obsahuje pět stereogenních center, molekula β -CD má tedy 35 chirálních center.²⁰ Na Obr. 1 jsou zobrazeny struktury základních CD.¹⁰



Obr. 1. Struktury α -, β - a γ -cyklodextrinu. Převzato z (cit.¹⁰)

Z hlediska dostupnosti, ceny, rozměrů kavity i širokému spektru látek, které jsou schopné vstoupit do kavity CD, tvoří většinu veškeré produkce převážně β -CD. Nejnižší rozpustnost z nativních cyklodextrinů má β -CD, ve kterém jsou sekundární hydroxylové

skupiny jednotlivých glukopyranosových jednotek orientovány tak, aby mezi sebou co nejvíce interagovaly prostřednictvím vodíkových interakcí.³⁵ Rozpustnost roste se zvyšující se teplotou, případně může být ovlivněna derivatizací hydroxylových skupin (např. zavedení sulfátových skupin).^{34,36} Polarita klesá s poloměrem kavity, což znamená od γ - po α -CD.³⁷

V Tab. 1 jsou uvedeny některé základní charakteristiky jednotlivých cyklodextrinů.

Tab. 1. Fyzikálně-chemické vlastnosti cyklodextrinů. Upraveno podle (cit.^{30,37}).

vlastnosti CD	typ cyklodextrinu		
	α -CD	β -CD	γ -CD
počet glukopyranosových jednotek	6	7	8
molární hmotnost (g/mol)	972	1135	1297
rozpustnost ve vodě při 25 °C (g 100 ml ⁻¹)	14,5	1,85	23,3
vnitřní průměr kavity (nm)	0,47-0,53	0,60-0,65	0,75-0,83
vnější průměr kavity (nm)	1,46	1,54	1,75
objem kavity (nm ³)	0,174	0,262	0,427

2.3.3 Inkluzní komplex

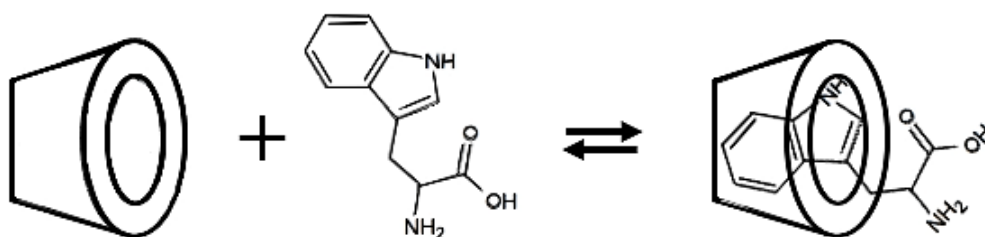
Základním principem separace analytů prostřednictvím CD je schopnost tvořit inkluzní komplexy. Mechanismus tvorby těchto komplexů je založen na tzv. „host-guest“ interakcích mezi hydrofobní kavitou a nepolární částí substrátu, který do ní vstupuje.³⁰ Tvorba komplexu je v roztoku řízena podle rovnovážné reakce:



jež je popisována zdánlivou rovnovážnou konstantou, která je definovaná jako

$$K = [\text{CD-S}]/[\text{CD}] \cdot [\text{S}], \quad (2.2)$$

kde [CD-S] odpovídá rovnovážné koncentraci inkluzního komplexu, [CD] značí rovnovážnou koncentraci volného cyklodextrinu a [S] rovnovážnou koncentraci volného substrátu.^{10,32,38} Nejčastěji jsou komplexy molekula CD:substrát tvořeny ve stechiometrických poměrech 1:1, 2:1, 1:2, 2:2 (cit.³⁴). Schéma tvorby inkluzního komplexu je znázorněno na Obr. 2.



Obr. 2. Schéma tvorby inkluzního komplexu.

Důležitou hnací silou při tvorbě inkluzních komplexů je substituce energeticky nevýhodných molekul vody z kavity CD nepolárním analytem. Snížení interakcí voda-kavita a voda-analyt vede k poklesu energie systému, což je výhodnější. Mezi další důležité interakce, které stabilizují vznikající komplex CD-substrát patří van der Waalsovy síly, vodíkové či hydrofobní interakce.³⁹

Velikost molekuly chirálního analytu má vliv na chirální rozpoznání. Vzhledem k větším rozměrům kavity u γ -CD je možné tvořit komplexy se dvěma a více molekulami. Z toho plyne, že molekula analytu musí být stericky kompatibilní s kavitou CD, aby do ní mohla alespoň částečně inkludovat. Pro vznik komplexů je také důležité, aby hostující molekula měla vyšší afinitu k CD než ostatní přítomné látky.²⁰

Dalšími podmínkami, které jsou nutné pro chirální separaci s využitím CD, jsou: aromaticita analyzovaných sloučenin, poblíž vstupu do kavity CD by se mělo nacházet chirální centrum analytu, v jehož blízkosti by měly být atomy umožňující tvorbu vodíkových interakcí pro stabilizaci komplexu.^{20,40}

2.3.4 Použití cyclodextrinů

Cyclodextriny jsou pro svou schopnost tvořit inkluzní komplexy široce využívány v různých průmyslových odvětvích, převážně ve farmaceutickém, chemickém, kosmetickém či potravinářském. Mezi hlavní výhody používání komplexů s CD patří ochrana molekuly, která je uvnitř kavity, jednak před rozkladnými procesy následkem světla, či tepla, nebo před hydrolýzou nebo oxidací. Pozitivní vliv mají i na rozpustnost

potravinářských barviv či vitamínů ve vodě, jsou schopné stabilizovat vonné a chuťové vlastnosti.^{10,41} Další důležitou vlastností je nízká toxicita derivatizovaných CD, které jsou používány za účelem zvýšení biodostupnosti, zlepšení stability či snížení nežádoucích účinků léčiv.³⁶ Příkladem může být karvakrol, což je monoterpenový fenol, který je součástí esenciálních olejů dobromysly obecné, tymiánu, majoránky aj. Pro své antibakteriální a antioxidační vlastnosti je vhodným potravinovým aditivem, avšak použití je limitováno jeho vysokou těkavostí a nízkou rozpustností ve vodě. Vznikem komplexu β -CD-karvakrol dochází ke zvýšení rozpustnosti ve vodě a také stability během skladování (odolnost komplexu vůči světlu).⁴² Nativní i derivatizované cyklodextriny jsou také hojně využívány k chirálním separacím v různých separačních technikách (např. HPLC, CZE, SFC aj.).¹⁴ V Tab. 2 jsou uvedeny příklady enantioseparace různých analytů na CSF obsahující derivatizované CD.

Tab. 2. Příklady enantioseparace různých analytů na CSF na bázi derivatizovaných CD.

Separované enantiomery	typ CSF	Složení MF	Cit.
7-hydroxyflavanon, 6-hydroxyflavanon	per(4-chlor-3-methyl)fenylkarbamát- β -CD	hexan/ethanol (80/20, v/v)	43
flavanon, 4-hydroxyflavanon	per(2-chlor-5-methyl)fenylkarbamát- β -CD	hexan/ethanol (80/20, v/v)	43
propranolol	<i>N</i> -benzyl-fenethylamino- β -CD	CH ₃ CN/CH ₃ OH/ CH ₃ COOH/ N(CH ₂ CH ₃) ₃ (95/5/0,5/0,5; v/v/v/v)	44
kyselina mandlová, DL- <i>p</i> -hydroxyfenylglycin	hydroxypropyl- β -CD	methanol/voda (50/50, v/v)	45
DL-tryptofan butylester	SBE- β -CD	methanol/kyselina mravenčí (60/40, v/v)	46

2.3.5 Deriváty cyklodextrinů

Derivatizace nativních cyklodextrinů zajišťuje získání určitých fyzikálně-chemických vlastností jako zvýšení rozpustnosti, vyšší stabilitu komplexů CD-hostující analyt nebo snazší uchycení na povrchu SF. Modifikace mohou probíhat na hydroxylových skupinách v polohách 2, 3 a 6.^{47,48}

Derivatizací hydroxylových skupin polární skupinou dochází k narušení vodíkových interakcí na okraji molekuly CD, což má za následek více interakcí volných hydroxylových skupin s molekulami vody a tím i zvýšení rozpustnosti modifikovaného CD.³⁵

Každá glukopyranosová jednotka obsahuje celkem tři hydroxylové skupiny, které mohou být derivatizovány. Maximální počet modifikovatelných hydroxylových skupin v α -, β - a γ -CD je 18, 21 a 24.⁴⁹ K derivatizaci molekuly CD jsou využívány jak nepolární (např. methyl, propyl), tak i polární skupiny (fosfátová skupina, kvarterní aminy, sulfoskupina aj.)

Deriváty CD mohou být neutrální, kladné či záporně nabité. Elektrostatickými interakcemi s molekulou analytu, která má opačný náboj, napomáhají ke stabilizaci vznikajícího komplexu.^{46,50}

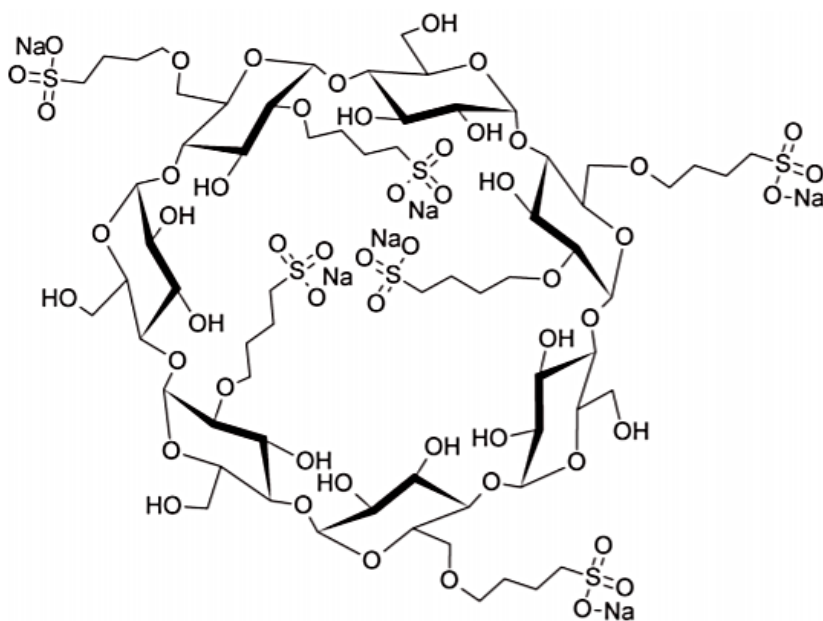
2.3.6 Sulfobutylether- β -cyklodextrin

Sulfobutylether- β -cyklodextrin (SBE- β -CD) je záporně nabitý cyklodextrin, který se využívá jako CS v HPLC, SFC, ale především v kapilární elektroforéze, kdy proti nativním CD poskytuje vyšší enantiosektivitu.^{14,46,51} SBE- β -CD je také velmi využíván jako nosič pro transport léčiv v organismu, např. transport dopaminu do mozku při léčbě Parkinsonovy choroby.⁵² Proti svému nativnímu analogu nepoškozuje ledviny a nevykazuje ani další jiné nežádoucí účinky nezávisle na způsobu podání.⁵³

Jako polyanion může být využit pro přípravu dynamicky pokrytých CSF. Přítomnost záporně nabitých sulfátových skupin umožňuje interagovat s kladně nabitým povrchem SF (anexy s funkční skupinou tvořenou kvarterní amoniiovou solí).⁴⁶

Stupeň substituce (DS, „degree of substitution“) je vyjádřen jako průměrná hodnota počtu substituovaných hydroxylových skupin CD. Poloha a přesný počet substituentů se liší v každé molekule CD.⁵³ Počet substituentů ovlivňuje schopnost tvorby inkluzních komplexů a tím i enantiosektivitu CS. Butylové řetězce mohou dodatečně stabilizovat komplex tím, že interagují s nepolární částí analytu, která se nachází vně kavity.⁵⁴

Na Obr. 3 je zobrazena struktura hexasubstituovaného SBE- β -CD.⁵³



Obr. 3. Struktura hexasubstituovaného SBE- β -CD. Převzato z (cit.⁵³)

2.4 Dynamické pokrytí („coating“)

Jedním ze způsobů přípravy CSF je pokrývání povrchu stacionární fáze chirálním selektorem (tzv. dynamický „coating“). Princip spočívá v přivádění roztoku obsahujícím rozpuštěný CS na stacionární fázi, kterou je např. intoměnič. Prostřednictvím iontových interakcí dochází k požadovanému navázání a pokrytí povrchu SF chirálním selektorem.⁴⁶

Dynamický „coating“ je alternativní cestou přípravy CSF, jež se vyznačuje efektivitou, jednoduchostí a rychlostí přípravy. Stabilita takto připravených SF je i několik měsíců. Mezi hlavní výhody dynamického „coatingu“ proti chemicky vázaným

SF patří možnost výměny CS za jiný. CS se vhodným vymývacím procesem odstraní a poté je provedeno znovupokrytí („recoating“) jiným CS.^{55,56}

Konkrétním příkladem může být enantioseparace dansylovaných aminokyselin na dynamicky „coatované“ SF *N*-(2-hydroxydodecyl)-vancomycinem⁵⁵ nebo oktadecylová SF dynamicky pokrytá *N*-decyl-*S*-trityl-(*R*)-cysteinem použitá pro separaci nederivatizovaných aminokyselin.⁵⁷

2.5 Modelové chirální analyty použité v této práci

2.5.1 Benzodiazepiny

Benzodiazepiny alostericky zesilují vazbu inhibičního neurotransmiteru kyseliny γ -aminomáselné (GABA) k jejímu receptoru a tím dochází k útlumu centrálního nervového systému. Z terapeutického hlediska mají široké spektrum využití: působí jako sedativa, hypnotika, snižují svalový tonus, mají anxiolytický účinek. Pro tyto vlastnosti jsou používány při celkové anestezii.⁵⁸ Oxazepam i lorazepam patří do skupiny 3-hydroxybenzodiazepinů, mají asymetrický atom uhlíku v poloze 3. Na rozdíl od oxazepamu má lorazepam atom chloru v poloze 9. *S*-enantiomer vykazuje několikanásobně vyšší biologickou aktivitu.³

2.5.2 Profeny

Profeny jsou deriváty kyseliny propionové a patří do významné skupiny tzv. nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAIDs – nonsteroidal anti-inflammatory drugs). Jejich mechanismem působení je inhibice enzymu cyklooxygenasy. Vykazují analgetický, antipyretický a antirevmatický účinek.⁵⁹ Modelovými analyty z této skupiny byly flurbiprofen, indoprofen, fenoprofen a karprofen. Jedná se o slabé kyseliny, hodnoty pK_a se pohybují v rozmezí 3,7 – 4,5. Chirální centrum se nachází v blízkosti karboxylové skupiny. Profeny jsou k dostání jako racemáty, přičemž biologicky aktivní jsou *S*-enantiomery.⁶⁰

2.5.3 β -blokátory

β -blokátory patří mezi léčiva používaná při kardiovaskulárních onemocněních především při poruchách srdečního rytmu, vysokém krevním tlaku či angině pectoris.

Působí jako antagonisté adrenalinu a noradrenalinu na adrenergických β -receptorech. Do této skupiny látek patří propranolol, alprenolol, pindolol, což jsou neselektivní β -blokátory obsahující jedno chirální centrum, a labetalol, který mimo β_1 -receptorů blokuje i α_1 -receptory a obsahuje dvě chirální centra.^{59,61} *S*-enantiomer je mnohonásobně účinnější než *R*-enantiomer, přičemž oba vykazují biologický účinek.³

2.5.4 Flavanony

Flavanony se řadí do skupiny flavonoidů, což jsou fenolické sloučeniny produkované jako sekundární metabolity rostlin. Tyto látky jsou významné zejména pro své antioxidační působení v lidském organismu. Jako většina flavanonů mají i hydroxylované flavanony 6-hydroxyflavanon a 7-hydroxyflavanon jeden asymetrický uhlík v poloze 2.^{62,63}

2.5.5 Deriváty fenothiazinů

Z farmakologického hlediska se řadí tyto látky mezi klasická antipsychotika (neuroleptika). Jedná se o léčiva, která oslabují působení mnoha neurotransmiterů v mozku tím, že blokují jejich receptory, což u pacientů způsobuje výrazný psychický i motorický útlum.⁶⁴ Mezi typické zástupce patří thioridazin. Druhou testovanou látkou byl promethazin, který má podobnou chemickou strukturu (planární tricyklický systém a postranní protonizovatelný dusík), ale je používán jako H_1 -antihistaminikum.⁵⁸ Fenothiaziny jsou dostupné jako racemáty, biologicky aktivnější je *S*-enantiomer.⁶⁰

2.5.6 Aminokyseliny a peptidy

Aminokyseliny a peptidy patří mezi významné stavební složky živých organismů. Dělí se na neproteinogenní a proteinogenní. Aminokyseliny vyskytující se v proteinech patří do konfigurační řady L a mimo glycin mají všechny stereogenní centrum, které představuje atom uhlíku v α -poloze.⁴ Testovanými aminokyselinami z této skupiny byly: DL-tryptofan, 5-F-DL-tryptofan, 5-OH-DL-tryptofan, DL-tryptofan butylester, *t*-Boc-DL-tryptofan. Syntéza peptidů může předcházet tzv. chránění funkční skupiny: esterifikace karboxylové skupiny nebo blokace aminoskupiny často *tert*-butoxykarbonylem (*t*-Boc).⁴ Byly testovány dva dipeptidy: glycyl-DL-tryptofan a glycyl-DL-fenylalanin.

2.5.7 Trogerova báze

Trogerova báze je chirální heterocyklická sloučenina, která byla poprvé syntetizována C. J. Ludwigem Trögerem v roce 1887. Strukturně se jedná o diamin, obsahuje dvě stereogenní centra na atomech dusíku. V roce 1944 byly její enantiomery poprvé chirálně separovány na speciálně připravené laktose V. Prelogem a jednalo se o vůbec první separovanou látku s chirálními atomy dusíku.⁶⁵

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- methanol, Chromasolv®, gradient grade (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- kyselina mravenčí, Reagent Grade (čistota ≥ 95 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- kyselina octová, ReagentPlus® (čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- octan amonný (čistota $\geq 99,00$ %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- deionizovaná voda upravena pomocí zařízení Ultrapur a Rowapur (Watrex®, Praha, Česká republika)
- sulfobutylether- β -cyklodextrin (DS $\sim 6,3$) sodná sůl (CycloLab LTD., Budapešť, Maďarsko)
- sulfobutylether- β -cyklodextrin (DS ~ 10) sodná sůl (CycloLab LTD., Budapešť, Maďarsko)
- Vzorky pro chirální separaci:
 - (*R,S*)-7-chlor-3-hydroxy-5-fenyl-1,3-dihydro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-on (oxazepam, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
 - (*R,S*)-2-hydroxy-5-{1-hydroxy-2-[(4-fenyl-2-butanyl)amino]ethylbenzamid hydrochlorid (labetalol hydrochlorid, čistota > 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
 - (*R,S*)-10-[2-(1-methyl-2-piperidiny)ethyl]-2-(methylsulfanyl)-10*H*-fenothiazin hydrochlorid (thioridazin, čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
 - (*R,S*)-*N,N*-dimethyl-1-(10*H*-fenothiazin-10-yl)-2-propanamin hydrochlorid (promethazin, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
 - (*R,S*)-7-chlor-5-(2-chlorfenyl)-3-hydroxy-1,3-dihydro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-on (lorazepam, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- (*R,S*)-1-(1*H*-indol-4-yloxy)-3-(isopropylamino)-2-propanol (pindolol, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(6-chlor-9*H*-karbazol-2-yl)propanová kyselina (carprofen, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(3-fenoxyfenylyl)propanová kyselina (fenoprofen, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(2-fluor-4-bifenylyl)propanová kyselina (flurbiprofen, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-[4-(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)fenylyl]propanová kyselina (indoprofen, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-5,13-dimethyl-1,9-diazatetracyklo[7.7.1.0^{2,7}.0^{10,15}]heptadeka-2,4,6,10,12,14-hexaen (Trogerova báze, čistota 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-6-hydroxy-2-fenyl-2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on (6-hydroxyflavanon, čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-7-hydroxy-2-fenyl-2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on (7-hydroxyflavanon, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- glycyl-DL-fenylalanin (Gly-DL-Phe, analytický standard, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA)
- glycyl-DL-tryptofan (Gly-DL-Trp, analytický standard, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA)
- 5-hydroxy-DL-tryptofan (5-hydroxy-DL-Trp, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- 5-fluor-DL-tryptofan (5-F-DL-Trp, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- DL-tryptofan butylester hydrochlorid (DL-Trp butylester hydrochlorid, analytický standard, Pfaltz & Bauer, Inc., Waterbury, Connecticut, USA)
- *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-D-tryptofan (*t*-Boc-D-Trp, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-tryptofan (*t*-Boc-L-Trp, analytický standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- DL-tryptofan (DL-Trp, čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-1-(isopropylamino)-3-(1-naftyloxy)-2-propanol hydrochlorid (propranolol hydrochlorid, čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-1-(2-allylfenoxy)-3-(isopropylamino)-2-propanol hydrochlorid (alprenolol hydrochlorid, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

3.2 Přístroje a pomůcky

3.2.1 Kapalinový chromatograf

- kapalinový chromatograf Agilent Technologies (Waldbronn, Německo)
 - detektor diodového pole Agilent Technologies 1260 Infinity (Waldbronn, Německo)
 - pumpa Agilent Technologies 1200 series (Waldbronn, Německo)
 - automatický dávkovač a odplyňovač mobilní fáze Agilent Technologies 1260 Infinity (Waldbronn, Německo)
 - termostat Agilent Technologies 1290 Infinity (Waldbronn, Německo)

3.2.2 Chromatografická kolona

- kolona Spherisorb® SAX 80Å, rozměry 4,6 × 100 mm, velikost částic 5 μm (Waters, Milford, Massachusetts, USA)

3.2.3 Ostatní přístroje a pomůcky

- analytické váhy Mettler AE 240 (Mettler, Greifensee, Švýcarsko)
- ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC30 (Elma, Singen, Německo)
- pH metr PHM 240 (Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie)
- filtry Minisart syringe 0,2 μm a 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Německo)

3.2.4 Programy

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation - sbírání dat a zpracování dat v softwaru (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- Origin, verze 6.1 - zpracování dat
- ACD/ChemSketch, verze 12.01
- PeakMaster, verze 5.1

3.3 Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny z pevných standardů navážením 1 mg standardu a následným rozpuštěním v 1 ml methanolu o výsledné koncentraci $c_M = 1 \text{ mg ml}^{-1}$. Vzorky, které nebyly rozpustné v čistém methanolu (DL-Trp, Gly-DL-Phe a Gly-DL-Trp) byly rozpuštěny ve směsi methanol/deionizovaná voda (v/v) v poměru 1:1. Takto připravené vzorky byly vloženy na 20 minut do ultrazvukové lázně a poté přefiltrovány přes 0,2 μm polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr. Většina vzorků byla $10 \times$ ředěna v závislosti na velikosti odezvy detektoru v průběhu měření.

3.4 Dynamické pokrytí stacionární fáze SBE- β -CD

Pro přípravu nových stacionárních fází obsahujících SBE- β -CD dynamickým pokrytím („coatingem“) byly použity iontově výměnné kolony Waters® SPHERISORB® 5 μm SAX 80Å, které obsahují kvarterní amin jako iontoměnič. Pro „coating“ byly použity SBE- β -CD se stupněm substituce 6,3 (DS \sim 6,3) a 10 (DS \sim 10). Požadované množství SBE- β -CD ($c_M = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) bylo rozpuštěno v mobilní fázi methanol/deionizovaná voda (40/60) (v/v). Tento roztok byl následně přiváděn na kolonu po dobu 2 hodin při průtoku 0,6 ml min⁻¹. Pro zjištění množství SBE- β -CD, které bylo zachyceno na koloně v průběhu pokrývání byla použita gravimetrická analýza. V prvním případě bylo na povrchu SF zachyceno 0,0564 g hexasubstituovaného SBE- β -CD a v druhém případě bylo na povrchu SF zachyceno 0,0734 g dekasubstituovaného SBE- β -CD. Připravené CSF byly stabilní pro více než 800 nástriků a měření byla opakovatelná. Pro zjištění opakovatelnosti přípravy CSF „coatingem“ byla nově připravena další CSF s hexasubstituovaným SBE- β -CD. Měření probíhalo v systému tvořeném MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (40/60) (v/v). Bylo testováno deset

vybraných analytů z původní chirální sady. Následně byly porovnány retence a rozlišení testovaných analytů na původní a nově připravené CSF. Příprava CSF dynamickým „coatingem“ byla opakovatelná s relativní směrodatnou odchylkou retenčních faktorů od 1-7 %.

3.5 Příprava mobilních fází

Roztok kyseliny mravenčí o pH 2,10 byl připraven pipetováním 14,50 ml kyseliny mravenčí do odměrné baňky o objemu 1 l a jejím následným doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Příprava 10mmol l⁻¹ roztoku octanu amonného o pH 4,00 a objemu 1 l byla provedena navážením 0,7708 g octanu amonného, který byl rozpuštěn v deionizované vodě. Do roztoku bylo přidáno vypočítané množství kyseliny octové (3 ml). Poté byla odměrná baňka s tímto roztokem doplněna po rysku deionizovanou vodou. Pufr byl přefiltrován přes 0,45μm PTFE filtr.

Koncentrace jednotlivých složek pufrů byly vypočítány pomocí počítačového programu PeakMaster 5.1.

Jako organický modifikátor byl použit methanol. Jednotlivá měření byla provedena v mobilních fázích methanol/vodná složka v poměrech od (90/10) (v/v) až do (10/90) (v/v) se změnou poměru po 10 objemových %.

3.6 Podmínky separace

Separace testované sady chirálních analytů byly prováděny v HILIC a RP módu. Dávkovaný objem vzorků byl 5 μl. Analýzy byly provedeny při průtoku mobilní fáze 1 ml min⁻¹. Pro detekci analytů byla zvolena vlnová délka 254 nm. Kolona byla v průběhu měření termostatována na 25 °C, vzorky na 20 °C. Tlak se měnil v závislosti na složení mobilní fáze. Maximální čas analýzy byl nastaven na 60 minut. Tyto podmínky byly stejné pro testování obou „coatovaných“ kolon.

3.7 Mrtvý čas kolony

Mrtvý čas kolony byl určen z rozpouštědlového píku pro každou mobilní fázi na obou „coatovaných“ stacionárních fázích. Zjištěné mrtvé časy jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3. Hodnoty mrtvých časů

Stacionární fáze	Mobilní fáze	t_M (min)
SBE- β -CD (DS ~ 6,3)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v)	1,14
	methanol/10mmol l ⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v)	1,15
SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v)	1,13
	methanol/10mmol l ⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v)	1,14

3.8 Chromatografické parametry

V kapitole „Výsledky a diskuse“ jsou v tabulkách uvedeny následující chromatografické parametry: rozlišení R , retenční faktor k , a faktor selektivity α , které byly vypočteny podle následujících vztahů:

$$R = 1,18 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_1 + w_2), \quad (3.1)$$

kde R je rozlišení dvou sousedních píků, které bylo spočítáno softwarem OpenLab®, $t_{R,1}$ a $t_{R,2}$ jsou retenční časy prvního a druhého eluujícího enantiomeru, w_1 a w_2 jsou šířky píků v polovině jejich výšky pro první a druhý eluující enantiomer.

$$k = (t_R - t_M) / t_M, \quad (3.2)$$

kde k je retenční faktor, t_R je retenční čas analytu a t_M mrtvý čas kolony.

$$\alpha = k_2 / k_1, \quad (3.3)$$

kde k_1 a k_2 jsou retenční faktory prvního a druhého eluujícího enantiomeru.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Chirální separace

Pro zjištění a porovnání enantioselektivity SBE- β -CD stacionárních fází byla vybrána následující sada strukturně odlišných chirálních analytů (Tab. 4). Všechny vybrané analyty obsahují ve své struktuře nepolární část, která může vstupovat do nepolární kavity SBE- β -CD a interagovat s ní. Struktury vybraných analytů jsou uvedeny v příloze A.

Tab. 4. Seznam analyzovaných látek

SADA CHIRÁLNÍCH ANALYTŮ		
oxazepam	6-hydroxyflavanon	glycyl-DL-tryptofan
lorazepam	7-hydroxyflavanon	DL-tryptofan
thioridazin	Trogerova báze	5-hydroxy-DL-tryptofan
promethazin	karprofen	5-fluor-DL-tryptofan
labetalol	fenoprofen	DL-tryptofan butylester
pindolol	flurbiprofen	<i>t</i> -Boc-DL-tryptofan
propranolol	indoprofen	
alprenolol	glycyl-DL-fenylalanin	

4.1.1 Chirální separace na připravené CSF s SBE- β -CD (DS ~ 6,3)

Pro separace enantiomerů vybrané sady chirálních látek byly použity dva typy mobilních fází. Nejprve byla použita MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) a jako druhá byla použita MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00). Měření probíhalo izokraticky od složení MF methanol/vodná složka (90/10) (v/v) do (10/90) (v/v) se změnou poměru po 10 objemových procentech.

Při objemových zastoupeních MF methanol/vodná složka (90/10) (v/v) do (60/40) (v/v), byla zjištěna pouze částečná enantioseparace u čtyř vybraných analytů při použití kyseliny mravenčí (pH 2,10) a u jednoho analytu při použití 10mmol l⁻¹ octanu amonného (pH 4,00) jako vodné složky MF. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5, která uvádí retenční časy t_R , rozlišení R , retenční faktory k a faktory selektivity α pro daná složení MF. Ostatní testované látky ve většině případů eluovaly s mrtvým časem kolony a nevykazovaly žádné známky separace. Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulkách I a II v příloze B.

Tab. 5. Retenční čas (t_R), rozlišení (R), retenční faktor (k) a faktor selektivity (α) vybraných analyzovaných látek při různých složeních mobilní fáze na připravené stacionární fázi s SBE- β -CD (DS ~ 6,3).

CSF s SBE-β-CD (DS ~ 6,3), MF: methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10)								
Název analytu	(v/v)				60/40 (v/v)			
	70/30 (v/v)							
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
karprofen	2,57	0,54	1,26	1,08	4,71	0,61	3,14	1,09
fenoprofen	2,01	-	0,76	1,00	3,29	0,44	1,90	1,06
7-hydroxyflavanon	2,47	-	1,17	1,00	4,14	0,16	2,64	1,02
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	2,29	-	1,01	1,00	2,93	0,93	1,54	1,15

CSF s SBE-β-CD (DS ~ 6,3), MF: methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný				
Název analytu	(pH 4,00) (v/v)			
	60/40 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α
7-hydroxyflavanon	4,42	0,32	2,85	1,03

V tabulce 6 jsou uvedeny retenční časy t_R , rozlišení R , retenční faktory k a faktory selektivity α všech testovaných chirálních analytů pro složení MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) od objemového poměru (40/60) (v/v) do (10/90) (v/v).

Tab. 6. Retenční čas (t_R), rozlišení (R), retenční faktor (k) a faktor selektivity (α) vybraných analyzovaných látek při různém složení mobilní fáze methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v) na připravené stacionární fázi s SBE- β -CD (DS ~ 6,3).

Název analytu	CSF s SBE- β -CD (DS ~ 6,3), MF: methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v)															
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
oxazepam	1,59	0,81	0,40	1,34	2,13	1,58	0,87	1,39	3,27	2,36	1,88	1,43	5,03	2,89	3,42	1,46
lorazepam	1,71	0,56	0,50	1,20	2,57	1,15	1,26	1,24	4,75	1,66	3,17	1,25	8,96	1,87	6,87	1,25
thioridazin	*	-	-	-	2,63	0,47	1,31	1,30	9,06	0,30	6,96	1,06	38,31	0,63	32,67	1,09
promethazin	*	-	-	-	*	-	-	-	1,18	0,16	0,03	2,30	2,88	0,47	1,53	1,21
labetalol	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	1,68	-	0,48	1,00
pindolol	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	1,18	-	0,04	1,00
propranolol	*	-	-	-	*	-	-	-	1,31	-	0,15	1,00	1,88	0,35	0,65	1,16
alprenolol	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	1,26	-	0,10	1,00
6-hydroxyflavanon	14,56	-	11,80	1,00	35,88	0,16	30,52	1,01	o	-	-	-	o	-	-	-
7-hydroxyflavanon	22,41	0,37	18,69	1,03	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
Trogerova báze	*	-	-	-	*	-	-	-	1,50	-	0,32	1,00	2,36	-	1,07	1,00

Pokračování Tab. 6

Název analytu	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
karprofen	37,80	0,90	32,22	1,10	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
fenoprofen	18,29	0,57	15,07	1,06	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
flurbiprofen	39,49	-	33,70	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
indoprofen	7,54	-	5,63	1,00	18,66	-	15,39	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-
Gly-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Gly-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-Trp	*	-	-	-	1,17	-	0,03	1,00	1,23	-	0,08	1,00	1,35	-	0,18	1,00
5-OH-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	1,17	-	0,03	1,00
5-F-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	1,25	-	0,09	1,00	1,42	-	0,25	1,00
DL-Trp butylester	*	-	-	-	*	-	-	-	1,17	1,00	0,03	18,32	1,69	2,05	0,48	3,35
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	9,61	1,88	7,45	1,24	21,68	2,30	18,05	1,26	o	-	-	-	o	-	-	-

(*) - analyt eluoval s mrtvým časem

(o) - analyt nebyl do 60 minut eluován

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu enantiomeru

Tabulka 6 ukazuje, že bylo částečně separováno pět testovaných látek a dva analyty byly separovány na základní linii. Jednalo se o strukturně velmi podobné benzodiazepinové deriváty – oxazepam a lorazepam. U enantiomerů oxazepamu docházelo k částečné separaci již od složení MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v), načež následným snížením obsahu organického modifikátoru o 10 objemových procent byla pozorována separace na základní linii s hodnotou rozlišení 1,58 a dobou analýzy do 4 minut. Lorazepam, který na rozdíl od oxazepamu obsahuje ve své molekule o atom chloru navíc, se podařilo chirálně separovat s hodnotou rozlišení 1,66 v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (20/80) (v/v) a dobou analýzy do 7 minut. S dalším snižováním obsahu methanolu v mobilní fázi docházelo u obou zmíněných analytů ke zvýšení retence a zvýšení hodnoty rozlišení.

V obou případech fenothiazinových derivátů, thioridazinu a promethazinu, došlo k částečné separaci s nejvyšší dosaženou hodnotou rozlišení 0,63 pro thioridazin a 0,47 pro promethazin v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v). S vyšším obsahem methanolu v MF (tj. od 40 objemových procent) tyto látky eluovaly s mrtvým časem kolony.

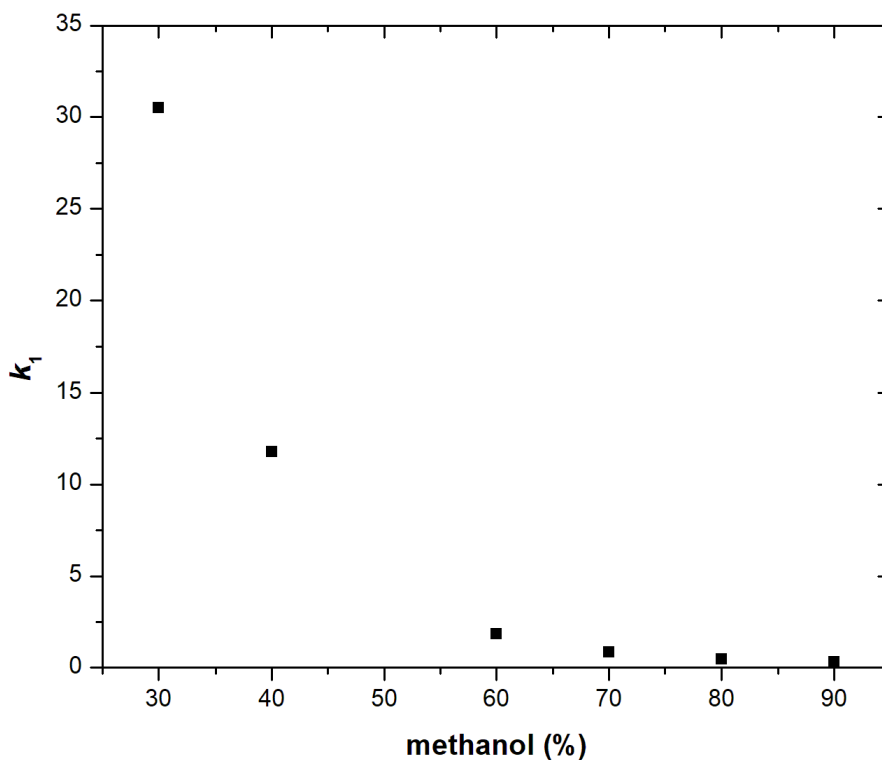
Trogerova báze ani β -blokátory labetalol a pindolol nevykazovaly za těchto podmínek žádnou enantioseparaci a eluovaly převážně s mrtvým časem kolony. Částečně byly separovány enantiomery β -blokátoru propranololu v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v) s hodnotou rozlišení 0,35. Naproti tomu alprenolol z téže skupiny nebyl ani částečně separován a eluoval převážně s mrtvým časem kolony s výjimkou objemového zastoupení methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v).

V případě flavonoidů je patrné, že poloha hydroxylové skupiny v molekule má významný vliv na retenci a enantioseparaci. V případě 6-hydroxyflavanonu docházelo k částečné enantioseparaci s hodnotou rozlišení 0,16 až v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (30/70) (v/v) s dobou analýzy do 40 minut, zatímco 7-hydroxyflavanon nebyl za těchto podmínek eluován do 60 minut. 7-hydroxyflavanon vykazoval vyšší retenci, avšak k jeho částečné enantioseparaci docházelo již v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (60/40) (v/v), což je uvedeno v Tab. I v příloze B. Nejvyšší hodnotu rozlišení 0,37 se podařilo získat za podmínek složení MF

methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v), s dalším snížením methanolu, došlo ke zvýšení retence, kdy doba analýzy 7-hydroxyflavanonu přesáhla 60 minut.

Ze čtyř analyzovaných profenů došlo k částečné enantioseparaci u karprofenu a fenoprofenu. Flurbiprofen a indoprofen nebyly separovány ani částečně. V případě karprofenu bylo dosaženo nejvyšší hodnoty rozlišení 0,90 v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v), proti tomu fenoprofen v tomto složení MF vykazoval o polovinu kratší dobu analýzy, ale i nižší hodnotu rozlišení 0,57. Od složení MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (30/70) (v/v) do (10/90) (v/v) nebyl žádný z vybraných profenů eluován do 60 minut.

Chromatografické chování, kdy se s klesajícím obsahem organického modifikátoru zvyšuje retence, je typickým příkladem pro reverzní separační mód. Výše zmíněný trend pozorovaný u profenů, flavonoidů, benzodiazepinů či fenothiazinů je graficky znázorněn na Obr. 4 na příkladu 6-hydroxyflavanonu.



Obr. 4. Závislost retenčního faktoru k_1 prvního eluujícího enantiomeru 6-hydroxyflavanonu na obsahu organického modifikátoru v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v) na stacionární fázi s SBE- β -CD (DS \sim 6,3).

Dipeptidy Gly-DL-Phe a Gly-DL-Trp nevykazovaly žádnou enantioseparaci, jak je vidět v tabulce 6, eluovaly ve všech testovaných poměrech s mrtvým časem kolony.

Enantiomery DL-tryptofanu se nepodařilo separovat, aminokyselina eluovala s mrtvým časem kolony až do 40 objemových procent organického modifikátoru. Z jeho derivátů nebyla prokázána separace ani u 5-hydroxy-DL-tryptofanu a 5-fluor-DL-tryptofanu. Pozitivní vliv na enantioseparaci měla přítomnost esterové skupiny. DL-tryptofan butylester se podařilo separovat na základní linii s hodnotou rozlišení 2,05 při složení MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v). Z důvodu blokování aminoskupiny *tert*-butoxykarbonylovou skupinou se podařilo separovat enantiomery *t*-Boc-DL-tryptofanu již v poměru (40/60) (v/v) methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) s rozlišením 1,88 a celkovou dobou analýzy do 15 minut.

Následně byla testována mobilní fáze o vyšší hodnotě pH, tj. methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný o pH 4,00 (v/v).

V tabulce 7 jsou uvedeny retenční časy t_R , rozlišení R , retenční faktory k a faktory selektivity α pro složení MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) od objemového poměru (40/60) (v/v) do (10/90) (v/v).

Tab. 7. Retenční čas (t_R), rozlišení (R), retenční faktor (k) a faktor selektivity (α) vybraných analyzovaných látek při různém složení mobilní fáze methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v) na připravené stacionární fázi s SBE- β -CD (DS ~ 6,3).

Název analytu	CSF s SBE- β -CD (DS ~ 6,3), MF: methanol/10mmol l ⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v)															
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
oxazepam	1,68	0,88	0,46	1,34	2,38	1,79	1,07	1,40	3,87	2,87	2,37	1,45	6,54	3,51	4,69	1,50
lorazepam	1,76	0,58	0,53	1,21	2,73	1,23	1,38	1,25	4,98	1,85	3,34	1,28	9,81	2,24	7,54	1,28
thioridazin	2,19	-	0,91	1,00	6,30	0,59	4,49	1,12	20,54	0,78	16,88	1,11	o	-	-	-
promethazin	*	-	-	-	1,34	-	0,16	1,00	2,50	-	1,17	1,00	4,89	0,55	3,26	1,09
labetalol	*	-	-	-	1,19	-	0,04	1,00	1,65	-	0,44	1,00	2,38	-	1,07	1,00
pindolol	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	1,45	-	0,26	1,00
propranolol	*	-	-	-	1,46	-	0,27	1,00	2,44	-	1,12	1,00	3,84	-	2,34	1,00
alprenolol	*	-	-	-	*	-	-	-	1,43	-	0,24	1,00	1,99	-	0,73	1,00
6-hydroxyflavanon	16,22	-	13,12	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
7-hydroxyflavanon	25,61	0,42	21,29	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
Trogerova báze	3,27	-	1,85	1,00	6,57	-	4,72	1,00	13,54	-	10,78	1,00	28,78	-	24,05	1,00

Pokračování Tab. 7

Název analytu	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
karprofen	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
fenoprofen	42,34	-	35,85	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
flurbiprofen	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
indoprofen	15,54	-	12,53	1,00	31,11	-	26,08	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-
Gly-DL-Phe	1,49	-	0,29	1,00	1,51	-	0,32	1,00	1,55	-	0,35	1,00	1,59	-	0,38	1,00
Gly-DL-Trp	2,09	-	0,82	1,00	2,23	-	0,94	1,00	2,38	-	1,07	1,00	2,56	-	1,22	1,00
DL-Trp	1,78	-	0,55	1,00	1,90	-	0,66	1,00	2,04	-	0,77	1,00	2,17	-	0,89	1,00
5-OH-DL-Trp	1,64	-	0,42	1,00	1,69	-	0,47	1,00	1,76	-	0,53	1,00	1,84	-	0,60	1,00
5-F-DL-Trp	1,80	-	0,57	1,00	1,98	-	0,72	1,00	2,17	-	0,88	1,00	2,34	-	1,03	1,00
DL-Trp butylester	*	-	-	-	1,33	1,87	0,16	4,79	2,07	2,53	0,80	2,40	3,23	4,74	1,81	2,27
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	48,43	0,20	41,15	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-

(*) - analyt eluoval s mrtvým časem

(o) - analyt nebyl do 60 minut eluován

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu enantiomeru

Změna pH vodné složky mobilní fáze měla za následek prodloužení retence u všech měřených analytů. Jak vyplývá z tabulky 6 a 7, došlo ke zlepšení rozlišení oxazepamu a lorazepamu s hodnotami 1,79 a 1,85 v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (30/70) (v/v) a MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (20/80) (v/v).

Zlepšení enantioseparace bylo pozorováno také u fenothiazinů thioridazinu a promethazinu s nejvyšším dosaženým rozlišením o hodnotách 0,78 a 0,55 v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (20/80) (v/v) a MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (10/90) (v/v).

U 7-hydroxyflavanonu byla získána mírně vyšší hodnota rozlišení 0,42, avšak 6-hydroxyflavanon nebyl separován ani částečně.

V tabulce 7 je vidět, že ani při změně složení mobilní fáze nedocházelo k enantioseparaci labetalolu, pindololu a Trogerovy báze. β -blokátor propranolol, který se v předchozí MF alespoň částečně separoval, v octanovém pufru nejevil žádné známky separace. Retence těchto analytů se prodlužovala s klesajícím obsahem organického modifikátoru.

V případě enantiomerů profenů, které se v pH 2,10 částečně separovaly, přechodem na MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v) nedochází k enantioseparaci u žádného z nich. Při 40 objemových procentech methanolu v mobilní fázi přesahovaly doby analýzy karprofenu a flurbiprofenu 60 minut.

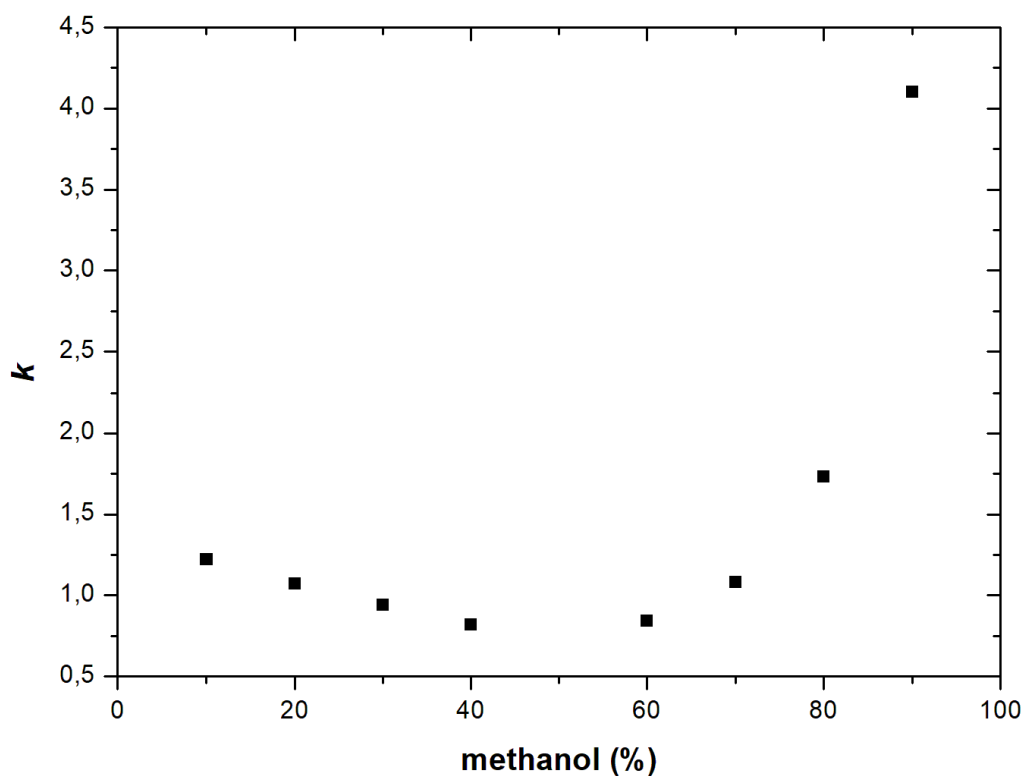
Z tabulky 7 vyplývá, že změna pH měla negativní vliv i na enantioseparaci blokové aminokyseliny *t*-Boc-DL-tryptofanu, která v tomto složení MF nejevila žádné známky separace a od 70 objemových procent vodné složky MF přesáhla doba analýzy 60 minut.

Ztráta enantioselektivity profenů i *t*-Boc-DL-tryptofanu může být vysvětlena tak, že zvýšením pH vodné složky MF na hodnotu 4,00 dochází k disociaci karboxylových skupin, což pravděpodobně sníží stereoselektivní interakce. Změna pH způsobuje i zvýšení retence, což může být způsobeno nestereoselektivními interakcemi s volnými skupinami kladně nabitého nosiče SF (iontoměnič).

V porovnání s použitím kyseliny mravenčí (pH 2,10) jako vodné složky MF došlo ke zlepšení enantioseparace DL-tryptofan butylesteru, kdy hodnota rozlišení byla 1,87 již

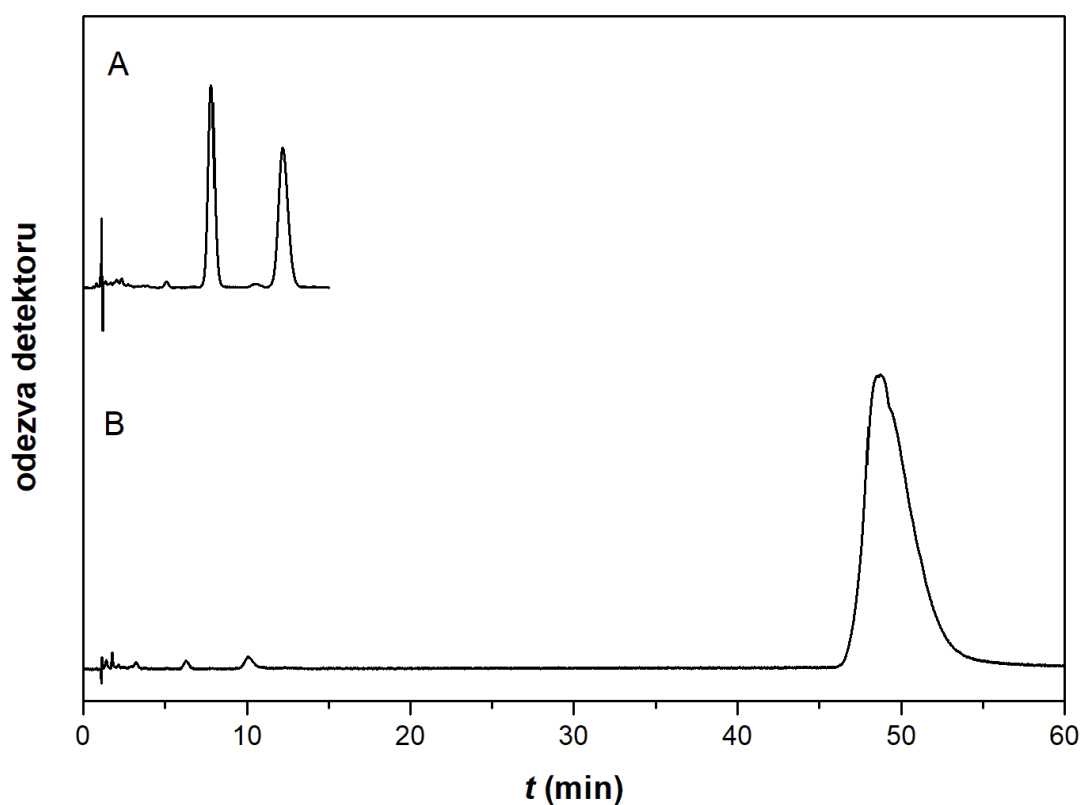
při složení mobilní fáze methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (30/70) (v/v) a enantiomery byly rozděleny na základní linii.

Jak je patrné z tabulky 7, separovány nebyly ani dipeptidy, DL-tryptofan a jeho deriváty 5-OH-DL-tryptofan a 5-F-DL-tryptofan. U těchto polárních látek bylo pozorováno zkracování retenčního času se snižujícím se obsahem organického modifikátoru do 60 objemových procent, což je typické pro separační mód hydrofilní interakční kapalinové chromatografie a dalším zvýšením vodné složky MF došlo k prodloužení retencí přechodem do reverzního separačního módu. Výše zmíněné chromatografické chování („U-tvar“ křivky) je znázorněno na obrázku 5 na příkladu Gly-DL-Trp.



Obr. 5. Závislost retenčního faktoru k glycyl-DL-tryptofanu na obsahu organického modifikátoru v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v) na stacionární fázi s SBE- β -CD (DS \sim 6,3).

Obrázek 6 znázorňuje chromatogramy separace blokované aminokyseliny *t*-Boc-DL-tryptofanu ve dvou různých složeních mobilní fáze. Z obrázku je patrný vliv pH vodné složky MF na enantioselektivitu separačního systému. Při použití MF o složení methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) byly enantiomery aminokyseliny separovány na základní linii s hodnotou rozlišení 1,88, kdežto v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v) při stejném objemovém zastoupení došlo k výraznému zhoršení enantioselektivity. Také doba analýzy se několikanásobně prodloužila, dosahovala téměř 60 minut. Z tvaru píku druhého chromatogramu je patrný pouze náznak separace.



Obr. 6. Chromatogramy separace enantiomerů *t*-Boc-DL-tryptofanu v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) (A) a v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (40/60) (v/v) (B) na připravené stacionární fázi s SBE-β-CD (DS ~ 6,3), průtok 1 ml min⁻¹, UV detekce při 254 nm.

4.1.2 Chirální separace na připravené CSF s SBE- β -CD (DS ~ 10)

Pro separace enantiomerů chirálních látek byly i v případě druhé připravené stacionární fáze použity dva typy mobilních fází. Nejprve byla použita MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) a jako druhá byla použita MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00). Měření probíhalo izokraticky od složení MF methanol/vodná složka (90/10) (v/v) do (10/90) (v/v) se změnou poměru po 10 objemových procentech.

Při objemových zastoupeních MF methanol/vodná složka (90/10) (v/v) do (60/40) (v/v) byla zjištěna enantioseparace u tří vybraných analytů, z toho jeden byl separován na základní linii, pouze při použití kyseliny mravenčí (pH 2,10) jako vodné složky MF. Tyto analýzy jsou ukázány v tabulce 8, která uvádí retenční časy t_R , rozlišení R , retenční faktory k a faktory selektivity α pro daná složení MF. Chromatografická data u ostatních testovaných chirálních látek, které nevykazovaly žádné známky separace v těchto objemových poměrech, jsou uvedeny v tabulkách III (pro kyselinu mravenčí, pH 2,10) a IV (10mmol l⁻¹ octan amonný, pH 4,00) v příloze B.

Tab. 8. Retenční čas (t_R), rozlišení (R), retenční faktor (k) a faktor selektivity (α) vybraných analyzovaných látek při různém složení mobilní fáze MF: methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v) na připravené stacionární fázi s SBE- β -CD (DS ~ 10).

CSF s SBE-β-CD (DS ~ 10), MF: methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10)								
Název analytu	(v/v)							
	80/20 (v/v)				70/30 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	1,78	1,07	0,58	1,20	1,87	1,92	0,65	1,35
fenoprofen	1,47	-	0,30	1,00	1,85	0,60	0,64	1,12
flurbiprofen	1,75	-	0,55	1,00	2,55	0,57	1,26	1,08
Název analytu	60/40 (v/v)							
	t_R (min)	R	k	α				
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	2,42	2,99	1,14	1,51				
fenoprofen	3,01	0,88	1,66	1,12				
flurbiprofen	4,97	0,66	3,40	1,08				

V tabulce 9 jsou uvedeny následující chromatografické parametry testované sady chirálních analytů: retenční časy t_R , rozlišení R , retenční faktory k a faktory selektivity α při použití MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) v objemových poměrech od (40/60) (v/v) do (10/90) (v/v).

Z této tabulky vyplývá, že došlo k separaci u osmi testovaných chirálních látek, z toho čtyři z nich byly separovány na základní linii. Stejně jako na předchozí koloně došlo k separaci benzodiazepinů oxazepamu a lorazepamu. U lorazepamu a oxazepamu byly pozorovány známky separace již od 60 a 70 objemových procent vodné složky MF. Se snižujícím se podílem organického modifikátoru v MF se zvyšovala jednak retence analytů a také jejich hodnota rozlišení. Oxazepam byl separován na základní linii s hodnotou rozlišení 1,93 v MF o složení methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v), lorazepam při objemovém poměru (20/80) (v/v) s hodnotou rozlišení 1,79.

Z analyzovaných fenothiazinů došlo k enantioseparaci téměř na základní linii pouze u thioridazinu. S hodnotou rozlišení 1,48 byly jeho enantiomery separovány v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v) s celkovou dobou analýzy do 30 minut. Naproti tomu promethazin eluoval s mrtvým časem kolony při všech objemových poměrech MF.

Z tabulky 9 je patrné, že došlo k částečné enantioseparaci také u všech profenů vyjma karprofenu. Od 60 objemových procent vodné složky v MF byla doba analýzy karprofenu vyšší než 60 minut. Fenoprofen a flurbiprofen byly částečně separovány již od objemového zastoupení methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (70/30) (v/v), což je i patrné z tabulky 8. Nejvyšší získané rozlišení enantiomerů analytů ze skupiny profenů bylo v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) s hodnotami 1,05 pro fenoprofen a 0,63 pro flurbiprofen i indoprofen. U těchto analytů však při dalším snížení organického modifikátoru v mobilní fázi nedocházelo k eluci do 60 minut. Profeny, stejně jako na předchozí stacionární fázi (s SBE- β -CD, DS \sim 6,3), vykazovaly typické reverzní chromatografické chování.

Tab. 9. Retenční čas (t_R), rozlišení (R), retenční faktor (k) a faktor selektivity (α) vybraných analyzovaných látek při různém složení mobilní fáze methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v) na připravené stacionární fázi s SBE- β -CD (DS ~ 10).

Název analytu	CSF s SBE- β -CD (DS ~ 10), MF: methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v)															
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
oxazepam	1,50	-	0,33	1,00	2,03	0,85	0,80	1,21	2,88	1,45	1,55	1,25	4,66	1,93	3,12	1,26
lorazepam	1,56	0,54	0,38	1,21	2,35	1,14	1,08	1,25	3,96	1,79	2,50	1,27	8,11	1,87	6,18	1,25
thioridazin	*	-	-	-	2,36	1,05	1,09	1,33	6,72	1,31	4,95	1,27	21,87	1,48	18,36	1,24
promethazin	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
labetalol	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
pindolol	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
propranolol	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	2,20	-	0,35	1,00
alprenolol	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
6-hydroxyflavanon	18,79	-	15,63	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
7-hydroxyflavanon	32,77	-	28,00	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
Trogerova báze	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-

Pokračování Tab. 9

Název analytu	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
karprofen	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
fenoprofen	20,37	1,05	17,02	1,10	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
flurbiprofen	46,09	0,63	39,78	1,06	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
indoprofen	7,33	0,63	5,49	1,08	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
Gly-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Gly-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
5-OH-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
5-F-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	1,16	-	0,02	1,00	1,43	-	0,27	1,00
DL-Trp butylester	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	1,84	5,01	0,63	4,73
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	7,82	4,86	5,92	1,65	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-

(*) - analyt eluoval s mrtvým časem

(o) - analyt nebyl do 60 minut eluován

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu enantiomeru

Enantiomery pindololu, labetalolu, alprenololu a Trogerovy báze nebyly separovány v žádném testovaném poměru MF, během všech analýz eluovaly s mrtvým časem kolony.

V tabulce 9 je vidět, že u většiny analyzovaných látek nejsou zaznamenána žádná chromatografická data, a to z toho důvodu, že u těchto látek docházelo k eluci s mrtvým časem kolony nebo naopak ve vysokých poměrech vodné složky MF nebyly některé analyty eluovány do 60 minut.

K separaci na základní linii s hodnotou rozlišení 4,86 a celkovou dobou analýzy do 15 minut došlo u *t*-Boc-DL-tryptofanu. Částečnou enantioseparaci tato blokováná aminokyselina jevila již od objemového zastoupení MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (80/20) (v/v), což lze vidět i v tabulce 8. Od 70 objemových procent vodné složky v MF byla její doba analýzy delší než 60 minut.

Zajímavé chování bylo pozorováno u enantiomerů DL-tryptofan butylesteru, které eluovaly až do poměru (20/80) (v/v) methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) s mrtvým časem kolony se známkami separace. Při dalším snížení methanolu (tj. na 10 objemových procent) došlo k separaci jeho enantiomerů na základní linii s hodnotou rozlišení 5,01. Doba analýzy byla do 5 minut.

Dále byla testována mobilní fáze o vyšší hodnotě pH, tj. methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný o pH 4,00 (v/v). Získané chromatografické parametry jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 10. Retenční čas (t_R), rozlišení (R), retenční faktor (k) a faktor selektivity (α) vybraných analyzovaných látek při různém složení mobilní fáze methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v) na připravené stacionární fázi s SBE- β -CD (DS ~ 10).

Název analytu	CSF s SBE- β -CD (DS ~ 10), MF: methanol/10mmol l ⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v)															
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
oxazepam	1,61	0,48	0,41	1,18	2,26	1,07	0,98	1,24	3,63	1,72	2,18	1,27	6,39	2,15	4,60	1,28
lorazepam	1,70	0,61	0,49	1,21	2,52	1,29	1,21	1,27	4,60	1,94	3,03	1,28	8,80	1,97	6,72	1,27
thioridazin	2,18	1,09	0,91	1,32	5,49	1,41	3,81	1,28	17,94	1,51	14,74	1,26	o	-	-	-
promethazin	1,18	-	0,03	1,00	1,54	-	0,35	1,00	2,62	-	1,30	1,00	4,32	-	2,79	1,00
labetalol	1,15	-	0,01	1,00	1,32	-	0,16	1,00	1,69	-	0,48	1,00	2,32	-	1,03	1,00
pindolol	*	-	-	-	1,16	-	0,01	1,00	1,40	-	0,23	1,00	N	-	-	-
propranolol	1,28	-	0,12	1,00	1,80	-	0,58	1,00	2,75	-	1,41	1,00	N	-	-	-
alprenolol	*	-	-	-	1,23	-	0,08	1,00	1,52	-	0,33	1,00	N	-	-	-
6-hydroxyflavanon	22,29	-	18,55	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
7-hydroxyflavanon	39,48	-	33,63	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
Trogerova báze	2,49	-	1,18	1,00	4,69	-	3,11	1,00	9,99	-	7,77	1,00	N	-	-	-

Pokračování Tab. 10

Název analytu	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α	t_R (min)	R	k	α
karprofen	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
fenoprofen	28,08	0,63	23,63	1,06	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
flurbiprofen	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
indoprofen	12,02	-	9,54	1,00	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
Gly-DL-Phe	1,42	-	0,25	1,00	1,45	-	0,27	1,00	1,46	-	0,28	1,00	N	-	-	-
Gly-DL-Trp	2,18	-	0,91	1,00	2,32	-	1,03	1,00	2,46	-	1,16	1,00	N	-	-	-
DL-Trp	1,71	-	0,50	1,00	1,82	-	0,60	1,00	1,93	-	0,69	1,00	N	-	-	-
5-OH-DL-Trp	1,59	-	0,40	1,00	1,66	-	0,46	1,00	1,72	-	0,51	1,00	N	-	-	-
5-F-DL-Trp	1,71	-	0,50	1,00	1,85	-	0,62	1,00	1,99	-	0,75	1,00	N	-	-	-
DL-Trp butylester	1,19	2,80	0,04	7,71	1,55	3,81	0,36	2,91	2,22	4,57	0,94	2,67	3,52	4,47	2,08	2,63
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	25,57	0,79	21,43	1,07	44,08	1,52	37,67	1,13	o	-	-	-	o	-	-	-

(N) - analýza neprovedena

(*) - analyt eluoval s mrtvým časem

(o) - analyt nebyl do 60 minut eluován

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu enantiomeru

Přechodem na 10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) jako vodnou složku MF došlo k výrazným změnám u většiny analýz. Z tabulky 10 vyplývá, že byla prodloužena retence analytů a zároveň byly separovány tři analyty na základní linii a jeden částečně.

Jako v předchozích případech byly na základní linii separovány enantiomery benzodiazepinů oxazepamu a lorazepamu. Znamky částečné separace jevíly již od 40 objemových procent methanolu v mobilní fázi a s jeho dalším snižováním se výrazně zvyšovala i hodnota rozlišení. Nejvyššího rozlišení bylo dosaženo v MF o složení methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (10/90) (v/v) s hodnotami 2,15 pro oxazepam a 1,97 pro lorazepam.

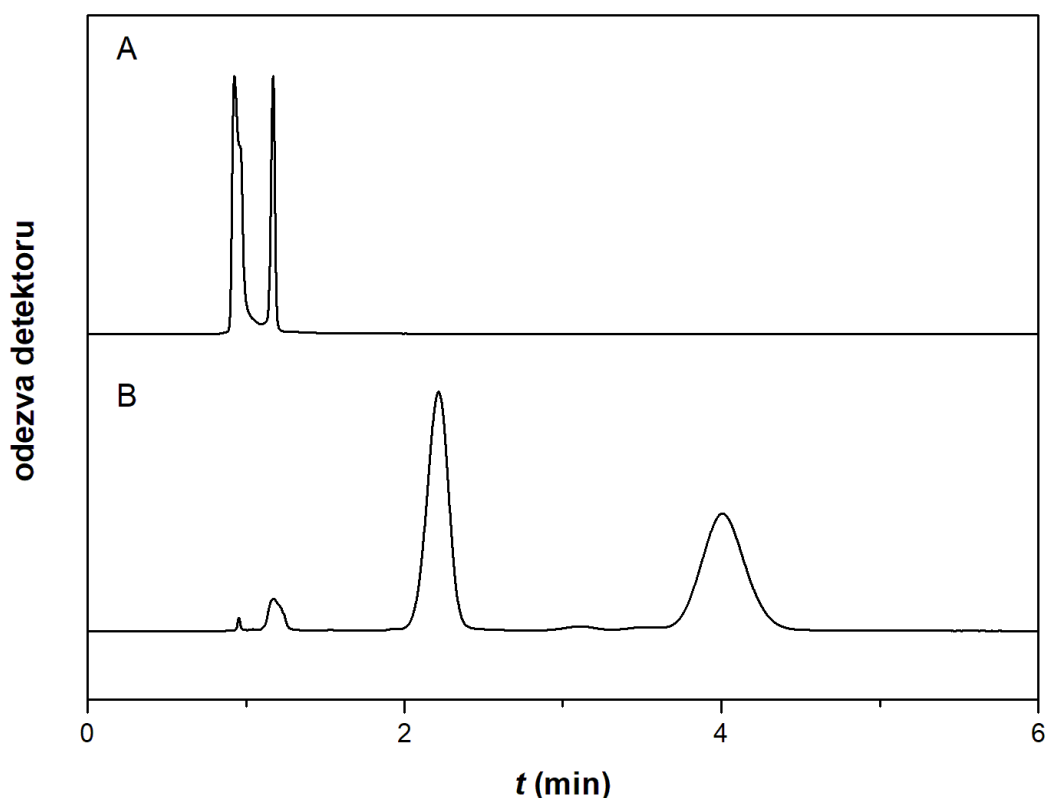
Enantiomery thioridazinu se podařilo separovat také na základní linii s hodnotou rozlišení 1,51 v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (20/80) (v/v). Jednalo se o nejvyšší získané rozlišení během všech prováděných měření.

Ze skupiny profenů byl částečně enantioseparován pouze jeden zástupce – fenoprofen s hodnotou rozlišení 0,63. Ostatní profeny nebyly od 60 objemových procent vodné složky v MF eluovány do 60 minut.

Změnou pH mobilní fáze nenastala změna ani v případě pindololu, labetalolu, alprenololu a propranololu. Pro enantioseparaci těchto β-blokátorů nebyl vhodný žádný z testovaných systémů (mimo náznaků separace enantiomerů propranololu při pH 2,10 na CSF s hexasubstituovaným SBE-β-CD). Jedná se o bazické látky, které jsou protonizované při obou hodnotách pH, což mohlo vést k odpuzování s nepokrytým nosičem iontoměniče a během velmi krátkých analýz nebyly interakce s CSF dostatečné pro enantioseparace těchto látek.

Ani v případě Trogerovy báze nedošlo k separaci, nicméně jak je vidět z tabulky 10, se snižujícím se obsahem organického modifikátoru se prodlužovala retence. Toto chování typické pro RP-HPLC bylo jako v předchozích případech sledováno i u dalších testovaných látek jako β-blokátorů, flavonoidů, benzodiazepinů či fenothiazinů.

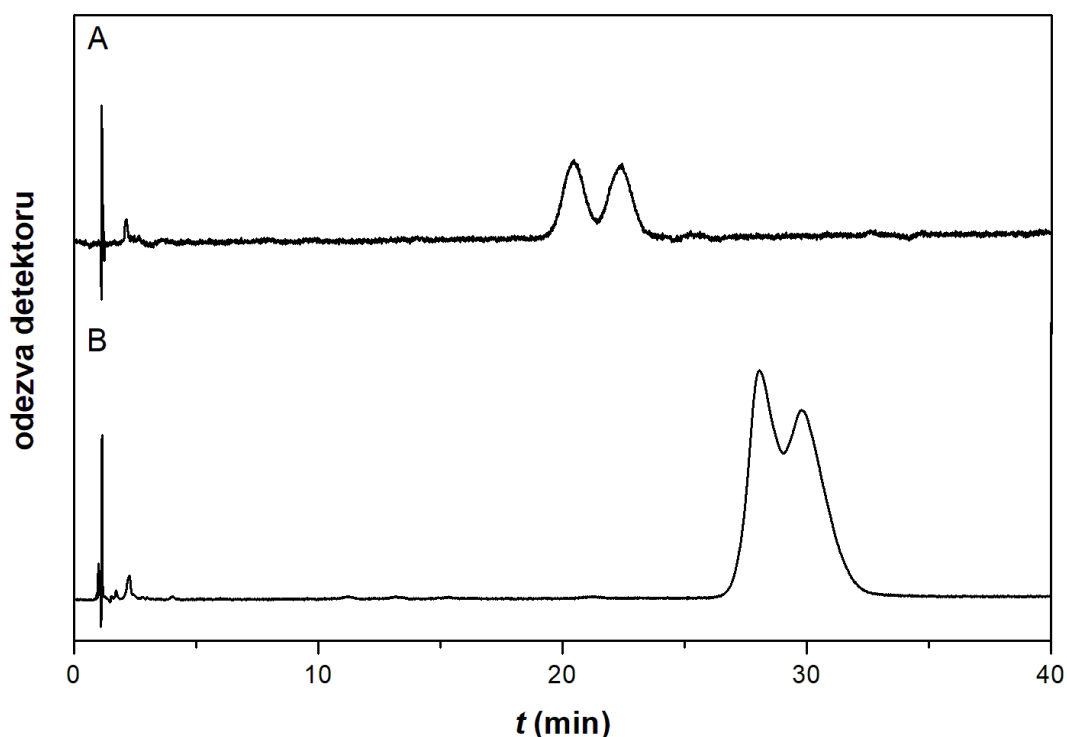
Z tabulky 10 vyplývá, že v případě aminokyselin a dipeptidů došlo k enantioseparaci pouze u *t*-Boc-DL-tryptofanu a DL-tryptofan butylesteru. V případě první zmíněné blokované aminokyseliny byly její enantiomery separovány na základní linii v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (30/70) (v/v), doba separace byla do 50 minut. Enantiomery DL-tryptofan butylesteru se dělily na základní linii již od 60 objemových procent methanolu v mobilní fázi s hodnotou rozlišení 2,80 a dobou analýzy do 2 minut. S dalším snižováním organického modifikátoru v MF se hodnota rozlišení výrazně zvýšila. Na obrázku 7 jsou znázorněny chromatogramy enantioseparace DL-Trp butylesteru v MF methanol/10mmol l⁻¹octan amonný (pH 4,00) v objemových poměrech (60/40) a (20/80) (v/v). V prvním případě je enantioseparace ovlivněna koelucí prvního píku s rozpouštědlovým píkem, v druhém případě jsou enantiomery děleny na základní linii s hodnotou rozlišení 4,57 a dobou analýzy do 5 minut.



Obr. 7. Chromatogramy enantioseparace DL-tryptofan butylesteru v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) v objemovém poměru (60/40) (v/v) (A) a v objemovém poměru (20/80) (v/v) (B) na připravené stacionární fázi s SBE-β-CD (DS ~ 10), průtok 1 ml min⁻¹, UV detekce při 254 nm.

U ostatních derivátů tryptofanu a i u nederivatizované aminokyseliny nebyla zaznamenána žádná enantioseparace. U těchto analytů bylo pozorováno zkracování retenčního času se snižujícím se obsahem organického modifikátoru do 60 objemových procent (HILIC) a dalším zvýšením vodné složky MF došlo k prodloužení retencí (RP-HPLC).

Na obrázku 8 jsou znázorněny chromatogramy separace fenoprofenu při dvou různých složeních mobilní fáze. Je možné pozorovat vliv pH vodné složky MF na enantioselektivitu separačního systému. Při použití MF o složení methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) byly enantiomery fenoprofenu částečně separovány s hodnotou rozlišení 1,05, zatímco v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v) při stejném objemovém poměru došlo k viditelnému zhoršení enantioselektivity. Doba analýzy byla v tomto případě delší, dosahovala téměř 35 minut a hodnota rozlišení byla 0,63.



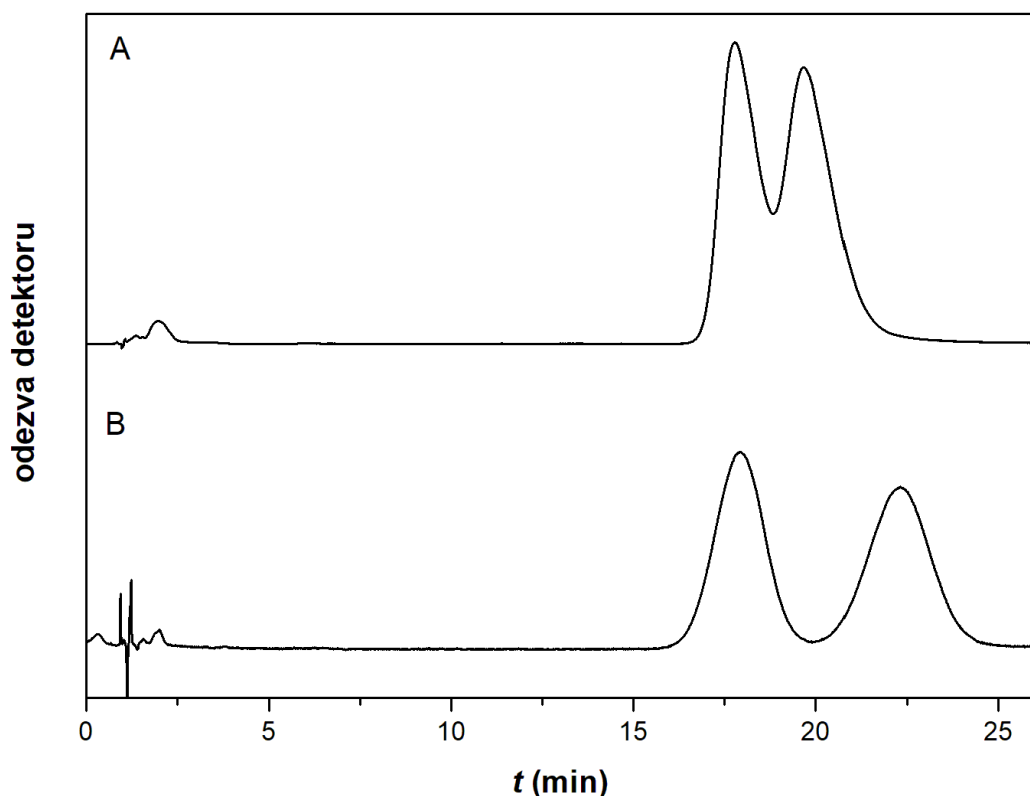
Obr. 8. Chromatogramy separace fenoprofenu v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) (A) a v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (40/60) (v/v) (B) na připravené stacionární fázi s SBE-β-CD (DS ~ 10), průtok 1ml min⁻¹, UV detekce při 254 nm.

Obecně lze říci, že vhodným systémem pro kyselé látky (profeny) je takový, jehož MF má složení methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v). V tomto případě nedochází k disociaci volné karboxylové skupiny a tím k možnému odpuzování se záporně nabitým SBE- β -CD na povrchu SF. Analýzy jsou kratší a enantiosektivita vyšší než při použití octanového pufru (pH 4,00), kdy dochází k disociaci karboxylové skupiny. To platí pro obě připravené CSF. Stejně chromatografické chování je pozorováno i u *t*-Boc-DL-tryptofanu, který má také volnou karboxylovou skupinu, ale zároveň blokovanou aminoskupinu.

4.1.3 Porovnání CSF s SBE- β -CD (DS ~ 6,3) a (DS ~ 10)

Porovnáním výsledků naměřených hodnot vybrané sady chirálních analytů na obou připravených stacionárních fázích bylo zjištěno, že největšího počtu alespoň částečně separovaných enantiomerů bylo dosaženo na SF s SBE- β -CD (DS ~ 6,3) v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10). Částečně bylo separováno sedm analytů, z toho tři látky, karprofen, 6-hydroxyflavanon a propranolol, které v ostatních separačních systémech nejevily žádné známky enantioseparace. Počet analytů separovaných na základní linii se výrazně nelišil, pouze v případě SF s SBE- β -CD (DS ~ 10) došlo k významnému zlepšení rozlišení u thioridazinu.

Na obrázku 9 jsou uvedeny chromatogramy separace thioridazinu, který byl separován na základní linii při použití stacionární fáze s dekasubstituovaným SBE- β -CD. Je vidět, že použití SF s hexasubstituovaným SBE- β -CD vedlo ke snížení hodnoty rozlišení, a tedy ke zhoršení separace enantiomerů, přičemž doba analýzy se významně nelišila.



Obr. 9. Chromatogramy separace enantiomerů thioridazinu v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (20/80) (v/v) na CSF s hexasubstituovaným SBE-β-CD (DS ~ 6,3) (A) a na CSF s dekasubstituovaným SBE-β-CD (DS ~ 10) (B), průtok

Stacionární fáze s hexasubstituovaným SBE-β-CD byla z hlediska analyzovaných látek vhodnější pro hydroxylované flavanony, kdežto SF s dekasubstituovaným SBE-β-CD poskytovala lepší výsledky pro téměř všechny profeny v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10). Obě připravené CSF byly vhodné pro separaci benzodiazepinů, vyšší enantioselektivity bylo dosaženo použitím octanového pufru (pH 4,00) jako vodné složky MF.

Vybrané dipeptidy glycyl-DL-tryptofan, glycyl-DL-fenylalanin, aminokyselinu DL-tryptofan a její deriváty se nepodařilo separovat v žádném testovaném separačním systému. V případě *t*-Boc-DL-tryptofanu a DL-tryptofan butylesteru, kdy má aminokyselina volnou pouze jednu ionizovatelnou skupinu (NH₂ nebo COOH), dochází k enantioseparaci ve všech testovaných systémech.

V tabulce 11 jsou shrnuty nejlepší získané podmínky pro enantioseparace analytů: typ připravené stacionární fáze, složení mobilní fáze, retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru (k_1) a rozlišení (R).

Tab. 11. Nejlepší získané výsledky pro enantioseparované analyty.

analyt	CSF	Složení MF	k_1	R
oxazepam	SBE- β -CD (DS ~ 6,3)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (30/70, v/v)	0,87	1,58
lorazepam	SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/10mmol l ⁻¹ octan amonný (pH 4,00), (20/80, v/v)	3,03	1,94
thioridazin	SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/10mmol l ⁻¹ octan amonný (pH 4,00), (20/80, v/v)	14,74	1,51
promethazin	SBE- β -CD (DS ~ 6,3)	methanol/10mmol l ⁻¹ octan amonný (pH 4,00), (10/90, v/v)	3,26	0,55
propranolol	SBE- β -CD (DS ~ 6,3)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (10/90, v/v)	0,65	0,35
karpofen	SBE- β -CD (DS ~ 6,3)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (40/60, v/v)	32,22	0,90
fenoprofen	SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (40/60, v/v)	17,02	1,05
flurbiprofen	SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (40/60, v/v)	39,78	0,63
indoprofen	SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (40/60, v/v)	5,49	0,63
6-hydroxyflavanon	SBE- β -CD (DS ~ 6,3)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (40/60, v/v)	30,52	0,16
7-hydroxyflavanon	SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (40/60, v/v)	21,29	0,42
DL-Trp butylester	SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (10/90, v/v)	0,63	5,01
<i>t</i> -Boc-DL-Trp	SBE- β -CD (DS ~ 10)	methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), (40/60, v/v)	5,92	4,86

5 ZÁVĚR

V rámci této práce byly připraveny dynamicky „coatované“ SBE- β -CD chirální stacionární fáze, které byly stabilní pro více než 800 nástřiků. Byly studovány enantioseparační schopnosti a enantioselektivita připravených CSF na sadě chirálních analytů ve dvou typech testovaných MF: methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v) a methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) (v/v) při různých objemových poměrech. Testovaná sada strukturně odlišných chirálních analytů obsahovala zástupce benzodiazepinů, fenothiazinů, profenů, flavanonů, β -blokátorů, tryptofan a jeho deriváty, dipeptidy a Trogerovu bázi. Připravené CSF byly následně vzájemně porovnány z hlediska retentivity a enantioselektivity.

Vyšší enantioselektivitu vykazoval systém tvořený CSF s hexasubstituovaným SBE- β -CD a MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10), kdy došlo u čtyř analytů k separaci enantiomerů na základní linii a u sedmi analytů byla pozorována částečná separace. Na CSF pokryté dekasubstituovaným SBE- β -CD bylo enantioseparováno celkem osm analytů, z nichž pět bylo separováno na základní linii.

V případě enantiomerů benzodiazepinů byly vhodné obě připravené CSF, enantiomery byly separovány ve všech testovaných systémech na základní linii, přičemž k enantioseparaci oxazepamu i lorazepamu docházelo od 60 objemových procent vodné složky MF pro SF s hexasubstituovaným i dekasubstituovaným SBE- β -CD.

Na SF s hexasubstituovaným SBE- β -CD byly částečně separovány enantiomery promethazinu při použití 10mmol l⁻¹ octanového pufru (pH 4,00) jako vodné složky MF, naopak thioridazin byl enantioseparován na základní linii s hodnotou rozlišení 1,51 v MF methanol/10mmol l⁻¹ octan amonný (pH 4,00) na SF s dekasubstituovaným SBE- β -CD.

Enantiomery β -blokátorů labetalolu, pindololu, alprenololu nebyly separovány na žádné z připravených CSF. Pouze u propranololu došlo k náznaku enantioseparace v MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v), ostatní β -blokátory eluovaly s mrtvým časem nebo s velmi nízkými retencemi i v MF s vysokým podílem vodné složky. Příčinou může být odpuzování β -blokátorů, které jsou protonizované při obou použitých pH vodné složky MF, s nepokrytým povrchem intoměniče.

V systému tvořeném CSF s dekasubstituovaným SBE- β -CD a MF methanol/kyselina mravenčí (pH 2,10) bylo možné enantioseparovat kromě karprofenu všechny profeny. V případě použití 10mmol l⁻¹ octanu amonného (pH 4,00) jako vodné složky MF docházelo k nárůstu retencí a ztrátě enantioselektivity.

Z výsledků je patrné, že žádný z testovaných systémů nebyl vhodný pro separaci enantiomerů DL-tryptofanu, 5-F-DL-tryptofanu, 5-OH-DL-tryptofanu, dipeptidů glycyl-DL-tryptofanu a glycyl-DL-fenylalaninu a Trogerovy báze.

Lze shrnout, že připravená CSF s dekasubstituovaným SBE- β -CD vykazuje vyšší enantioselektivitu pro profeny: fenoprofen, flurbiprofen a indoprofen a zároveň na ní bylo možné separovat enantiomery thioridazinu, což v případě použití hexasubstituovaného SBE- β -CD nebylo možné. Obecně lze říci, že CSF s hexasubstituovaným SBE- β -CD vykazovala enantioselektivitu pro širší spektrum analytů.

6 POUŽITÁ LITERATURA

1. Lämmerhofer, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217 (6), 814.
2. Chankvetadze, B. In *Liquid Chromatography (Second Edition)*; Elsevier, 2017.
3. Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Chiral drugs: an overview. *International journal of biomedical science: IJBS* **2006**, 2 (2), 85.
4. McMurry, J. *Organická chemie*, 2007.
5. Gal, J. Louis Pasteur, language, and molecular chirality. I. Background and dissymmetry. *Chirality* **2011**, 23 (1), 1.
6. Červinka, O. Chiralita a pojmy s ní související. *Chem. Listy* **1999**, 93, 294.
7. Anzenbacher, P.; Jezdinský, J. Léčiva a chiralita. *Klinická farmakologie a farmacie* **2003**, 148.
8. Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced organic chemistry: part A: structure and mechanisms*; Springer Science & Business Media, 2007.
9. Štulík, K. Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek. *VŠCHT, Praha* **2006**, 45.
10. Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23 (7), 1631.
11. Gao, J.; Qu, H.; Zhang, C.; Li, W.; Wang, P.; Zhou, Z. Direct chiral separations of the enantiomers of phenylpyrazole pesticides and the metabolites by HPLC. *Chirality* **2017**, 29 (1), 19.
12. Mori, T.; Ito, T.; Liu, S.; Ando, H.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, Y.; Tokunaga, E.; Shibata, N.; Handa, H.; Hakoshima, T. Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Scientific reports* **2018**, 8 (1), 1294.
13. Alizadeh, T. Development of a new method based on chiral ligand-exchange chromatography for the enantioseparation of propranolol. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* **2017**, 16 (3), 1037.

14. Gübitz, G.; Schmid, M. G. Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review. *Biopharmaceutics & drug disposition* **2001**, 22 (7-8), 291.
15. Subramanian, G. *Chiral separation techniques: a practical approach*; John Wiley & Sons, 2008.
16. Taylor, D. R.; Maher, K. Chiral separations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **1992**, 30 (3), 67.
17. Ilisz, I.; Aranyi, A.; Pataj, Z.; Péter, A. Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2012**, 69, 28.
18. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A. Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2008**, 47 (1), 1.
19. Ward Timothy, J.; Ward Karen, D. Chiral Separations by High-Performance Liquid Chromatography Update based on the original article by Timothy J. Ward and Tanya M. Oswald, Encyclopedia of Analytical Chemistry, © 2000, John Wiley & Sons, Ltd. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* **2012**.
20. Bressolle, F.; Audran, M.; Pham, T.-N.; Vallon, J.-J. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1996**, 687 (2), 303.
21. Berthod, A.; ACS Publications, 2006.
22. Gübitz, G. Separation of drug enantiomers by HPLC using chiral stationary phases—a selective review. *Chromatographia* **1990**, 30 (9-10), 555.
23. Okamoto, Y.; Ikai, T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. *Chemical Society Reviews* **2008**, 37 (12), 2593.
24. Geryk, R.; Kalíková, K.; Vozka, J.; Plecítá, D.; Schmid, M. G.; Tesařová, E. Enantioselective potential of chiral stationary phases based on immobilized polysaccharides in reversed phase mode. *Journal of Chromatography A* **2014**, 1363, 155.

25. Haginaka, J. Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations. *Journal of Chromatography A* **2001**, 906 (1-2), 253.
26. Hyun, M. H. Characterization of liquid chromatographic chiral separation on chiral crown ether stationary phases. *Journal of separation science* **2003**, 26 (3-4), 242.
27. Vozka, J.; Kalíková, K.; Janečková, L.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E. Chiral HPLC separation on derivatized cyclofructan versus cyclodextrin stationary phases. *Analytical Letters* **2012**, 45 (16), 2344.
28. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A. Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216 (10), 1845.
29. Schmid, M. G.; Gübitz, G. Enantioseparation by chromatographic and electromigration techniques using ligand-exchange as chiral separation principle. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2011**, 400 (8), 2305.
30. Del Valle, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry* **2004**, 39 (9), 1033.
31. Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics* **2007**, 329 (1-2), 1.
32. Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical reviews* **1998**, 98 (5), 1743.
33. Wenz, G. Cyclodextrins as building blocks for supramolecular structures and functional units. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1994**, 33 (8), 803.
34. Laza-Knoerr, A. L.; Gref, R.; Couvreur, P. Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of drug targeting* **2010**, 18 (9), 645.
35. Hedges, A. In *Starch (Third Edition)*; Elsevier, 2009.
36. Szente, L.; Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Advanced drug delivery reviews* **1999**, 36 (1), 17.
37. Horský, J.; Jindřich, J. Cyklodextriny ve světě polymerů. *Chemické listy* **2013**, 107, 769.

38. Stella, V. J.; He, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic pathology* **2008**, 36 (1), 30.
39. Loftsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of pharmaceutical sciences* **1996**, 85 (10), 1017.
40. Easton, C. J.; Lincoln, S. F. *Scaffolds and Templates for Supramolecular Chemistry*; World Scientific, 1999.
41. Buschmann, H.-J.; Schollmeyer, E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *Journal of cosmetic science* **2002**, 53 (3), 185.
42. Santos, E. H.; Kamimura, J. A.; Hill, L. E.; Gomes, C. L. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT-Food Science and Technology* **2015**, 60 (1), 583.
43. Tang, J.; Lin, Y.; Yang, B.; Zhou, J.; Tang, W. Functionalities tuned enantioselectivity of phenylcarbamate cyclodextrin clicked chiral stationary phases in HPLC. *Chirality* **2017**, 29 (9), 566.
44. Li, L.; Cheng, B.; Zhou, R.; Cao, Z.; Zeng, C.; Li, L. Preparation and evaluation of a novel N-benzyl-phenethylamino- β -cyclodextrin-bonded chiral stationary phase for HPLC. *Talanta* **2017**, 174, 179.
45. Yuan, L. M.; Ma, W.; Xu, M.; Zhao, H. L.; Li, Y. Y.; Wang, R. L.; Duan, A. H.; Ai, P.; Chen, X. X. Optical resolution and mechanism using enantioselective cellulose, sodium alginate and hydroxypropyl- β -cyclodextrin membranes. *Chirality* **2017**, 29 (6), 315.
46. Kučerová, G.; Procházková, H.; Kalíková, K.; Tesařová, E. Sulfobutylether- β -cyclodextrin as a chiral selector for separation of amino acids and dipeptides in chromatography. *Journal of Chromatography A* **2016**, 1467, 356.
47. Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T. Methods for selective modifications of cyclodextrins. *Chemical Reviews* **1998**, 98 (5), 1977.
48. Dodziuk, H. *Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications*; John Wiley & Sons, 2006.
49. Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *Aaps Pharmscitech* **2005**, 6 (2), E329.

50. Kučerová, G.; Kalíková, K.; Procházková, H.; Popr, M.; Jindřich, J.; Coufal, P.; Tesařová, E. Chromatographic Characterization of a New Cationic β -CD Based Stationary Phase Prepared by Dynamic Coating. *Chromatographia* **2016**, 79 (9-10), 529.
51. Desiderio, C.; Fanali, S. Use of negatively charged sulfobutyl ether- β -cyclodextrin for enantiomeric separation by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1995**, 716 (1-2), 183.
52. Di Gioia, S.; Trapani, A.; Mandracchia, D.; De Giglio, E.; Cometa, S.; Mangini, V.; Arnesano, F.; Belgiovine, G.; Castellani, S.; Pace, L. Intranasal delivery of dopamine to the striatum using glycol chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin based nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, 94, 180.
53. Puskás, I.; Varga, E.; Tuza, K.; Szemán, J.; Fenyvesi, É.; Sohajda, T.; Szente, L. In *Cyclodextrins: Synthesis, Chemical Applications and Role in Drug Delivery*; Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2015.
54. Zia, V.; Rajewski, R. A.; Stella, V. J. Thermodynamics of binding of neutral molecules to sulfobutyl ether β -cyclodextrins (SBE- β -CDs): the effect of total degree of substitution. *Pharmaceutical research* **2000**, 17 (8), 936.
55. Pittler, E.; Schmid, M. G. Enantioseparation of dansyl amino acids by HPLC on a monolithic column dynamically coated with a vancomycin derivative. *Biomedical Chromatography* **2010**, 24 (11), 1213.
56. Schmid, M. G.; Schreiner, K.; Reisinger, D.; Gübitz, G. Fast chiral separation by ligand-exchange HPLC using a dynamically coated monolithic column. *Journal of separation science* **2006**, 29 (10), 1470.
57. Carotti, A.; Ianni, F.; Camaioni, E.; Pucciarini, L.; Marinozzi, M.; Sardella, R.; Natalini, B. N-Decyl-S-trityl-(R)-cysteine, a new chiral selector for “green” ligand-exchange chromatography applications. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2017**, 144, 31.
58. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. *Barevný atlas farmakologie*; Grada Publishing as, 2007.
59. Hynie, S. *Farmakologie v kostce*; Triton, 2001.

60. Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
61. Mehvar, R.; Brocks, D. R. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. **2001**.
62. Yanez, J. A.; Andrews, P. K.; Davies, N. M. Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. *Journal of Chromatography B* **2007**, 848 (2), 159.
63. Fanali, C.; Fanali, S.; Chankvetadze, B. HPLC separation of enantiomers of some flavanone derivatives using polysaccharide-based chiral selectors covalently immobilized on silica. *Chromatographia* **2016**, 79 (3-4), 119.
64. Lincová, D.; Farghali, H. "Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. 672 s," ISBN 978-80-7262-373-0.
65. Sergeyev, S. Recent developments in synthetic chemistry, chiral separations, and applications of Tröger's base analogues. *Helvetica Chimica Acta* **2009**, 92 (3), 415.